

**Entwicklung von Homologie-Modellen
der Cytochrome P450 2A5 und 2A6**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Gunther Stahl
aus Böblingen

Düsseldorf 2002

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Gutachter	Univ. Prof. Dr. H.-D. Höltje
2. Gutachter	Univ. Prof. Dr. P. Proksch

Tag der mündlichen Prüfung 08. Mai 2002

Um den aufwändigen Druck und die hohen Kosten für Farbabbildungen zu vermeiden wurden alle Abbildungen dieser Arbeit in schwarz-weiß gedruckt. Die Farbversion der Arbeit inclusive aller Abbildungen ist im Internet unter: www.ulb.uni-duesseldorf.de unter der Auswahl *Elektronische Dissertationen* einsehbar.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Cytochrome P450	11
2.1	Historischer Überblick	11
2.2	Funktion	14
2.3	Einteilung der CYPs	15
2.4	Aufbau	16
2.5	Der katalytische Mechanismus	20
2.6	Wichtige Beispiele	23
2.6.1	CYP3A	23
2.6.2	CYP2D6	25
2.6.3	CYP2C	25
2.6.4	CYP1A	26
2.6.5	CYP2E1	27
2.6.6	CYP2A	28
3	Cytochrom P450 2A	29
3.1	Vorkommen und Funktion	29
3.2	Was wir bisher über CYP2A5/6 wissen	32
3.2.1	Liganden	33
3.2.2	Regulierung	34
3.2.3	Mutationen	36
3.2.4	Computermodelle	39

4	Problemstellung und Zielsetzung	43
5	Methoden	45
5.1	Kraftfelder	46
5.1.1	CVFF-Kraftfeld	46
5.1.2	GROMOS96-Kraftfeld	46
5.1.3	Ewald-Methode (PME)	48
5.2	Distance Restraints	49
5.3	Homologie-Modelling	51
5.4	AutoDock	52
5.5	GRID / GOLPE	53
6	Durchführung und Ergebnisse	57
6.1	Ähnlichkeit der Kristallstrukturen	58
6.1.1	Sequenzvergleich der Cytochrom P450-Kristallstrukturen	58
6.1.2	Automatischer Strukturvergleich	59
6.1.3	Alignment	66
6.1.4	Sekundärstruktur-Vorhersagen	67
6.2	Auswahl der Modellsequenz	71
6.3	Auswahl der Template	71
6.4	Modellaufbau	75
6.4.1	Strukturkonservierte Bereiche (SCR)	75
6.4.2	Strukturvariable Bereiche	75
6.4.3	Energie-Minimierung der Loops	77
6.4.4	Einbau des Häm	79
6.4.5	Verbesserung der Seitenketten-Konformationen	79
6.5	Modelloptimierung	79
6.5.1	Die Wasserbox	79
6.5.2	Äquilibrierung	81
6.5.3	Dynamik	82
6.6	Kontrolle des Modells	84
6.6.1	Analyse der berechneten Energieinhalte	84

6.6.2	RMSD-Wert	85
6.6.3	Proteingeometrie (PROCHECK)	87
6.6.4	Sekundärstrukturen	91
6.6.5	Konservierte Salzbrücken	91
6.6.6	Koordination am Eisen	94
6.7	Einbau von Substraten	94
6.7.1	Auswahl einer geeigneten Proteinstruktur	95
6.7.2	Auswahl der Substrate	97
6.7.3	Positionierung der Substrate	98
6.7.4	Dynamik und Ergebnisse	100
6.8	Sauerstoff im aktiven Zentrum (Wildtyp)	102
6.8.1	Röntgenstruktur von CAM mit Sauerstoff	102
6.8.2	CYP2A5 mit O ₂	103
6.8.3	Auswertung	105
6.8.4	Dynamik und Ergebnisse (Wildtyp)	106
6.9	Mutation F209N	109
6.9.1	Bau und Dynamik ohne Substrat	109
6.9.2	Dynamik und Ergebnisse (F209N)	111
6.10	Mutation F209L	116
6.10.1	Bau und Dynamik ohne Substrat	116
6.10.2	Dynamik und Ergebnisse (F209L)	117
6.11	Zusammenfassung der Ergebnisse	122
6.11.1	Gemeinsame Kontakte	122
6.11.2	Auswertung der Dynamiken	123
6.12	Mutation G207P	127
6.13	3D QSAR-Untersuchung	132
6.13.1	Modellerstellung	132
6.13.2	Interpretation der Felder	137
6.13.3	Vorhersage	139
6.14	CYP2A6 (Wildtyp)	140
6.14.1	Bau und Dynamik	140

6.14.2 Kontrolle des Modells	141
6.15 CYP2A5 - CYP2A6 – Ein Vergleich	143
7 Diskussion	147
8 Zusammenfassung	153
A Bezeichnung der Aminosäuren	169
B Verwendete Hard- und Software	171
C Abkürzungsverzeichnis, Einheiten	173
D INSIGHT II-BCL-Macros	175
D.1 Atomkoordinaten_CORTI.bcl	175
D.2 Atomkoordinaten_DEOXY.bcl	179

Kapitel 1

Einleitung

Moderne Analyseverfahren, wie zum Beispiel die Polymerase-Kettenreaktion, haben das Wissen über Protein-Sequenzen enorm wachsen lassen. Waren vor 10 Jahren rund 25.000 Sequenzen in der SWISS-PROT-Datenbank hinterlegt, so finden sich dort nun weit über 100.000 Sequenzen [1]. Als Folge aus dem *Human Genome Project*, der Aufklärung des menschlichen Genoms steht zu erwarten, dass auch das menschliche Proteom, die Protein-Ausstattung des Menschen, in naher Zukunft zu immer größeren Teilen aufgeklärt wird und die Anzahl an bekannten Protein-Sequenzen weiter steigen lässt.

Die Kenntnis der Abfolge der Aminosäuren in einem Protein gibt leider nicht immer Auskunft über dessen Funktion und gar keine Auskunft über sein räumliches Aussehen. Dabei ist gerade der dreidimensionale Aufbau eines Proteins, die Lage der Aminosäuren im Raum zueinander, der entscheidende Faktor für die Funktion des Proteins. Bei Enzymen entscheidet die dreidimensionale Struktur des aktiven Zentrums und der eventuellen Zugangskanäle, sollte das aktive Zentrum nicht an der Oberfläche liegen, ob eine Substanz für dieses Enzym völlig uninteressant ist, als Inhibitor fungiert oder als Substrat akzeptiert wird.

Leider sind die Methoden der 3-D-Strukturaufklärung bei Proteinen nicht so schnell, wie die Methoden der Sequenzaufklärung. Die Zahl der aufgeklärten Proteinstrukturen stieg zwar in den letzten 10 Jahren von 906 auf 16358, allerdings wird hier jeder Kristall mit anderen Liganden oder einer Punktmutation einzeln gezählt. Es ergeben sich

so viele Wiederholungen und Mehrfachzählungen eines Proteins. Die große Lücke, die durch das langsamere Fortschreiten der Strukturaufklärung entsteht, kann durch moderne computertechnische Methoden, wie das *Molecular Modelling* verkleinert werden.

Man setzt hierzu insbesondere das homologiebasierte Protein-Modelling ein (*homos (griech.): zusammen, gemeinsam*). Dabei benutzt man schon bekannte (aufgeklärte) Strukturen und versucht auf Grund der Sequenz-Ähnlichkeit mit strukturell noch unbekanntem Proteinen die 3-D-Struktur dieser Aminosäure-Sequenzen in einem Computer-Modell darzustellen. Die Methode beruht auf der Erkenntnis, dass ähnliche Sequenzen oft auch ähnliche Strukturen bilden. So eröffnet sich über das Homologie-Modelling die Möglichkeit, die schon vorhandenen Erkenntnisse zu nutzen, um Modelle unbekannter Proteine im Computer zu erschaffen. Wegen des hohen Aufwands dieser Methode und der Beschränkung durch die Anzahl an schon aufgeklärten Strukturen, kann sie nicht routinemäßig für alle gefundenen Sequenzen eingesetzt werden. Es ist eine Beschränkung auf wichtige Proteine nötig, für die mindestens eine Struktur vorhanden ist, die als Vorbild dienen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine aus der Klasse der Cytochrom P450-Enzyme untersucht. Die bearbeiteten Cytochrome dienen der Verstoffwechslung vieler Substanzen, darunter sind Arzneistoffe und diverse Umweltgifte. Das Wissen über Stoffwechselwege einzelner Arzneistoffe kann die Pharmakotherapie mit den jeweiligen Stoffen beeinflussen. Tierische Versuchsmodelle sind gerade in diesem Punkt nur in wenigen Fällen auf den Menschen übertragbar, weil schon kleine Unterschiede in der Aminosäure-Verteilung im aktiven Zentrum den Stoffwechsel stark verändern. Die Kenntnis über den Aufbau der aktiven Zentren der verschiedenen Cytochrome P450 erlaubt Schlüsse über die Bedeutung der Spezies-Unterschiede für einzelne Substanzen.

Auch die individuelle Enzym-Ausstattung jedes Menschen sorgt für Unterschiede bei der Verstoffwechslung. Hier kann das Wissen über die Auswirkung einzelner Mutationen im Genom auf die räumliche Struktur der codierten Proteine eine individuelle Therapie ermöglichen.

Kapitel 2

Cytochrome P450

Cytochrome P450 (CYP) gehören zu einer der am weitesten verbreiteten Klasse von Enzymen. Ihr Vorkommen umfasst alle bekannten Spezies, angefangen bei Bakterien über Pflanzen und Tiere bis zum Menschen.

2.1 Historischer Überblick

Es wird angenommen, dass sich die Cytochrom P450-Superfamilie im Lauf von ungefähr 1,4 Milliarden Jahren aus einem gemeinsamen Vorläufer-Gen entwickelt hat. Das darauf kodierte Ur-Cytochrom entstand vermutlich in einem primordialen, prokaryotischen Organismus und diente dem Schutz dieses Organismus vor dem sich entwickelnden atmosphärischen Sauerstoff. Mit der Fähigkeit, den relativ aggressiven molekularen Sauerstoff zu binden und zu verarbeiten, haben sich die Organismen die Möglichkeit geschaffen zu überleben.

Heute findet man Cytochrome P450 (CYPs) in allen aeroben Organismen und auch in vielen Anaerobiern. Betrachtet man einen phylogenetischen Stammbaum der CYPs (Abb. 2.1), so fällt unter anderem auf, dass die Aufspaltung der Familie 2 in weitere Unterfamilien vor ca. 400 Millionen Jahren geschah, etwa zeitgleich mit der Kolonialisierung des Landes durch Tiere. Die CYP2-Familie kommt nur in Tieren vor und man nimmt an, dass die Tiere diese Cytochrome als Antwort auf eine "chemische Kriegsführung" der Landpflanzen gebildet haben, die Gifte als Fraß-Schutz produzieren. Die

Gifte werden dabei, durch die Umsetzung mit Sauerstoff, in eine Form überführt, die besser ausscheidbar ist.

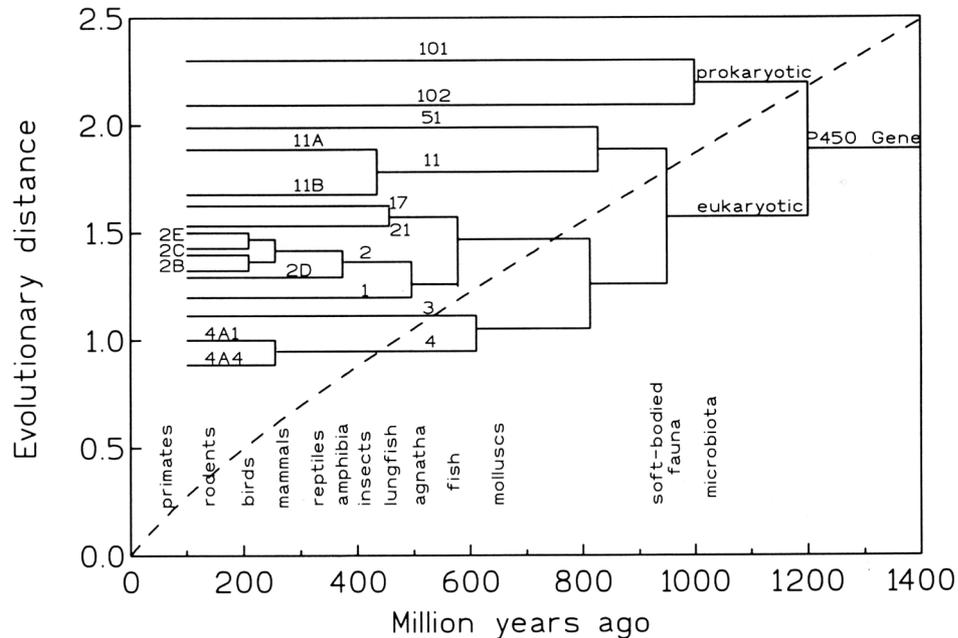


Abbildung 2.1: Verkürzter phylogenetischer Stammbaum der Cytochrome P450. Die Aufspaltung der ausschließlich in Tieren vorkommenden CYP2-Familie fand vor ca. 400 Mio. Jahren statt, als Tiere begannen, die Landmassen zu besiedeln (aus [2]).

Der Name Cytochrom P450 stammt aus den Anfängen der Forschung an dieser Enzymklasse. Im Jahr 1958 wurde in Leberzellen ein rotes Farbpigment (P) identifiziert, das bei Bindung von Kohlenmonoxid (CO) ein charakteristisches UV-Maximum bei 450 nm aufwies [3, 4]. Mittlerweile teilt man Enzyme in die Gruppe der Cytochrome P450 ein, wenn sich in der Sequenz eine streng konservierte Region aus 10 Aminosäuren in der Nähe des C-terminalen Endes des Proteins findet [5, Muster:PS00086]. Bislang wurden mehrere hundert Gen-Sequenzen identifiziert, die diese konservierte Region aufweisen. Da Cytochrome P450 in vielen Bakterien und quasi allen Eukaryoten vorkommen, spricht man auch von einer Protein-Superfamilie. [6]

Die Benennung der einzelnen CYPs erfolgt in folgender Weise:

- mit der ersten Zahl werden die Enzyme in Familien eingeteilt. Um zur selben Familie zu gehören, muss die Sequenz-Identität zweier Cytochrome größer als 40 % sein (z. B. CYP2)
- an nächster Stelle steht ein Buchstabe für die Einteilung in Unterfamilien (Sequenz-Identität > 70 %) (z. B. CYP2A)
- die letzte Ziffer gibt die Identifizierung innerhalb der Unterfamilie an (z. B. CYP2A6). Ist die Sequenz-Identität größer als 97 % so tragen zwei Proteine die gleiche Bezeichnung, auch wenn sie aus unterschiedlichen Spezies stammen.

Eine andere Einteilung der Cytochrome P450 richtet sich nach funktionellen Gesichtspunkten und wird in Kap. 2.3 vorgestellt.

Es sind heute mindestens 260 CYP-Gen-Familien bekannt, von denen mindestens 69 in Säugetieren vorkommen [7]. Nach der nun nahezu vollständigen Aufklärung des menschlichen Genoms geht man davon aus, dass der Mensch über 53 verschiedene Cytochrom P450-Enzyme verfügt [8]. Betrachtet man die Anzahl an CYPs, die im Genom anderer Spezies kodiert sind, so fällt auf, dass schon das Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* über etwa 20 CYPs verfügt, der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* besitzt 80, die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* 83 und die Pflanze *Arabidopsis thaliana* besitzt 286 CYPs. Allerdings findet man im Bakterium *Saccharomyces cerevisia* nur 3 und *Escherichia coli* gar keine Cytochrome.

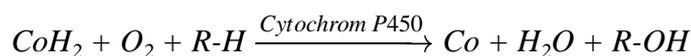
In Säugetieren haben CYPs entweder die Aufgabe wichtige Produkte zu biosynthesisieren (Steroid-Hormone, Vitamine, Mediatoren) oder sie sind metabolisch aktiv und fördern die Ausscheidung verschiedenster Substanzen (siehe Kap. 2.2). Die größere Anzahl an CYPs bei Pflanzen ist durch die besonderen Lebensumstände der Pflanzen zu erklären. Die CYPs dienen einerseits der Synthese von verschiedenen Farbstoffen, die oft der Anlockung von Insekten zu Fortpflanzungszwecken dienen, und andererseits zur Produktion von unterschiedlichsten Fraßgiften zur Verteidigung gegen Pflanzenfresser. So dienen die Cytochrome P450 bei Pflanzen unter anderem dazu Fraßgifte zu produzieren und bei Pflanzenfressern dazu diese Gifte möglichst effektiv unschädlich zu machen.

2.2 Funktion

Cytochrome P450 katalysieren so unterschiedliche Reaktionen wie Dealkylierungen, Hydroxylierungen, Dehalogenierungen, Dehydratisierungen und Nitroreduktionen. Der allergrößte Teil der Cytochrom P450-Enzyme sind allerdings Oxygenasen. Diese katalysieren die Spaltung von atmosphärischem Sauerstoff (O_2) zu Wasser und einem aktivierten Sauerstoff-Atom, das in eine Kohlenwasserstoff-Bindung des Substrats (R) eingefügt wird. Man bezeichnet diese Cytochrome daher auch als *Monoxygenasen*.

Bei den Substraten kann es sich um Heterozyklen, Aromaten, Alkane oder auch Alkene handeln. Zur Durchführung der Reaktion benötigen die Cytochrome noch einen reduzierten Co-Faktor (CoH_2 ; z. B. $NADPH + H^+$), nach dem die CYPs nochmals in Klassen eingeteilt werden (siehe Kapitel 2.3).

Die Monoxygenierungs-Reaktion folgt also der allgemeinen Formel:



Cytochrome P450 haben in der Natur unterschiedliche Aufgaben. Manche CYPs sind hochspezifische Enzyme, die bei der Synthese körpereigener Substanzen an entscheidender Stelle beteiligt sind. Andere sind eher unspezifisch und setzen bei Metabolisierungsreaktionen eine Vielzahl unterschiedlicher Stoffe um. Die hochspezifischen Enzyme sind meist für stereo- und regioselektive Hydroxylierungen bei Biosynthesen verantwortlich (zur Veranschaulichung sind hier die Familien aufgeführt, die beim Menschen vorkommen):

- **CYPs 5 und 8** werden in der Prostacyclin- und Thromboxan-Biosynthese benötigt.
- **CYPs 11, 17, 19 und 21** katalysieren Hydroxylierungs-Reaktionen bei der Biosynthese von Steroid-Hormonen aus Cholesterol.
- **CYPs 7, 24, 27, 46 und 51** sind an der Hydroxylierung von Vorstufen von Cholesterol, Gallensäuren und Vitamin D3 beteiligt.

Die anderen beim Menschen vorkommenden Cytochrom-Familien (**CYPs 1-4**) sind am Metabolismus exogener Stoffe (Arzneimittel, Umweltchemikalien und andere Xe-

nobiotika) und endogener lipophiler Substanzen beteiligt. Die von diesen Cytochromen durchgeführten Reaktionen können alle dem Phase-I-Metabolismus zugeordnet werden, in dem die umgesetzten Stoffe polarer gemacht und in eine Form überführt werden, in der sie besser konjugiert und/oder ausgeschieden werden können. Der Anteil, den Phase-I- und/oder Phase-II-Reaktionen (Glucuronidierung, Sulfatierung, Acetylierung) am Metabolismus eines bestimmten Stoffes haben, hängt stark von der Struktur der jeweiligen Substanz ab.

Nicht alle Reaktionen, die von diesen metabolisierenden CYPs katalysiert werden, sind durchweg nützlich. Es werden auch Reaktionen katalysiert, die Prokarzinogene aktivieren und in ihre karzinogene Form überführen (z. B. Aflatoxin B₁, 1,3-Butadien, N-Nitrosodiethylamin [9]).

2.3 Einteilung der CYPs

Beim Ablauf der katalytischen Reaktion der Cytochrome P450 werden Redox-Äquivalente (Elektronen und Protonen) benötigt. Je nachdem, welches Elektronentransfersystem ein Cytochrom benutzt, unterscheidet man vier Klassen [10]:

Klasse I Cytochrome P450 der Klasse I arbeiten mit einer FAD¹-abhängigen Reduktase, bei der die Reduktion durch ein Eisen-Schwefel-Redoxin (Fe₂S₂) vermittelt wird. In diese Klasse gehören alle bakteriellen CYPs, sowie CYPs, die in Mitochondrien lokalisiert sind. Die Reduktionsäquivalente werden bei Bakterien durch NADH² geliefert, bei den mitochondrialen CYPs wird diese Aufgabe von NADPH übernommen. Den Elektronen-Shuttle übernimmt in diesen CYPs Adrenodoxin, das dem bakteriellen Redoxin sehr ähnlich ist. Diese Ähnlichkeit im Redox-System der prokaryotischen Einzeller und der eukaryotischen Mitochondrien hat zu der Vermutung geführt, dass zwischen diesen eine evolutionäre Verbindung bestehen könnte.

Klasse II besteht aus menschlichen und tierischen mikrosomalen CYPs. Diese Enzyme verwenden nur NADPH als Reduktionsäquivalent und arbeiten mit einer

¹FAD: Flavin-Adenin-Dinucleotid

²NAD/NADP: Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid/-Phosphat

FAD- und FMN³-abhängigen Reduktase. Die Enzyme dieser Klasse sind membranständig. In Säugetier-Mikrosomen kann auch Cytochrom b₅ (ein Cytochrom aus der Atmungskette) als eine zweite Quelle der Elektronenlieferung genutzt werden. Als Reduktant dient hier NADH, und der Elektronentransfer wird durch eine Cytochrom b₅-Reduktase vermittelt. Dieses Enzym scheint hauptsächlich für den zweiten Reduktionsschritt bei der mikrosomalen Umsetzung verwendet zu werden [11–13].

Eine Ausnahme bildet CYP102 (P450_{BM-3}) aus *Bacillus megaterium*, das als bakterielles Enzym über eine kovalent gebundene Reduktase verfügt. Diese Reduktase besteht aus einer FAD- und einer FMN-bindenden Domäne und vermittelt den Elektronentransfer aus NADPH. Somit gehört CYP102, trotz seines bakteriellen Ursprungs zu Klasse II.

Klasse III Cytochrome P450 der Klasse III sind unabhängig von äußeren Reduktionssystemen. Sie katalysieren keine Monooxygenierungen, sondern verwenden Endoperoxide und Hydroperoxide als Substrate, die schon Sauerstoff enthalten. Zu dieser Klasse gehören unter anderen die Thromboxan-Synthase (CYP5A1) und die Prostacyclin-Synthase (CYP8).

Klasse IV zählt bislang nur einen Vertreter. Es handelt sich um die NO-Reduktase (NOR), die ihre Elektronen ohne Beteiligung eines weiteren Transportsystems direkt von NADH erhält.

Die Struktur der mikrosomalen NADPH-Cytochrom P450-Reduktase aus Klasse II ist aufgeklärt [14]. Es handelt sich dabei um ein membrangebundenes Enzym, das aus vier Domänen besteht, die FMN, NADP⁺ und FAD binden, wobei die vierte Domäne als Linker zwischen den ersten drei dient und die Domänen in die korrekte räumliche Anordnung bringt.

2.4 Aufbau

Der dreidimensionale Aufbau von Enzymen ist für ihre Funktion von entscheidender Bedeutung. In Enzymen, die man zu Familien zusammenfasst und die eine gemeinsa-

³FMN: Flavin-Mono-Nucleotid

me Funktion besitzen, trifft man daher oft auf eine gleiche räumliche Struktur und eine hohe Sequenzidentität.

Trotz einer zum Teil sehr geringen Sequenzidentität unter den Cytochromen von zum Teil deutlich weniger als 20 %, scheint der dreidimensionale Aufbau bei allen CYPs gleich zu sein. Die geringe Sequenzidentität ist erklärbar aus der Funktion der Cytochrome P450. Da Cytochrome eine möglichst große Zahl strukturell sehr unterschiedlicher Substanzen umsetzen müssen (vgl. Kap. 2.2), muss sich die Diversifikation unter den Substraten auch in der Sequenz zeigen. Der konservierte räumliche Aufbau der CYPs ist demnach wichtig für das korrekte Arbeiten des Proteins, die große Variation in der Sequenz erlaubt aber die enorme Substratvielfalt.

Die oben angestellten Überlegungen finden Bestätigung bei der Anwendung von Computerprogrammen, die die Sekundärstruktur von Proteinen vorhersagen. In allen Cytochrom-Sequenzen erscheinen Helices und Faltblätter in gleicher Reihenfolge, was schon auf einen identischen räumlichen Aufbau hinweist. In großen Alignments von Cytochrom-Sequenzen wurden neben der für alle Cytochrome typischen Identifizierungssequenz noch mehrere andere konservierte Aminosäuren gefunden, die wichtige Funktionen zur Ausbildung der gemeinsamen dreidimensionalen Struktur erfüllen (z. B. Bindung der prosthetischen Gruppe (Häm) an das Protein oder die konservierte Wechselwirkung zweier Aminosäuren aus verschiedenen Helices). Es sind also wenige Aminosäuren ganz entscheidend für die korrekte Faltung und Funktion eines CYPs verantwortlich. Mutationen an diesen Positionen sind daher immer kritisch zu betrachten.

Als Beispiel seien die humanen Cytochrome CYP2A7 und CYP2A6 genannt. Sie unterscheiden sich in nur 33 Positionen, d. h. die Sequenzidentität beträgt 93,3 %. CYP2A7 ist aber im Gegensatz zu CYP2A6 enzymatisch nicht aktiv [15]. Die meisten der 33 Änderungen sind konservative Mutationen an nicht entscheidenden Stellen (z. B. T294S, N418D, E419D). Die Mutation an Position 128 (R128L) allerdings ist nicht konservativ und in einer entscheidenden konservierten Position. Sie führt dazu, dass das Häm nicht in das Protein inkorporiert werden kann und so CYP2A7 keine enzymatische Aktivität aufweist.

Alle beschriebenen theoretischen Erkenntnisse wurden in den bisher bekannten und aufgeklärten Cytochrom-Kristallstrukturen (Tabelle 2.1) bestätigt. Die erkannten

konservierten Aminosäuren finden sich bei allen Kristallstrukturen in vergleichbaren räumlichen Positionen wieder. Sie ermöglichen die grundlegende Faltung der Proteine, durch die Helices und Faltblätter in ähnliche räumliche Bereiche zu liegen kommen (Abb. 2.2). Es bestätigt sich also, dass die Cytochrome P450 trotz ihrer geringen Sequenzidentität gleiche Sekundärstrukturen ausbilden (Helices und Faltblätter), die durch wenige konservierte Aminosäuren in eine vergleichbare Tertiärstruktur gebracht werden.

Tabelle 2.1: Liste aller bisher aufgeklärten Cytochrom-Strukturen in der PDB-Datenbank [16]. Bei den Kristallstrukturen wird die aktuelle Nomenklatur der Cytochrome aus historischen Gründen oft noch nicht verwendet^a. CYP2C5 ist das einzige ursprünglich membranständige Enzym. NOR ist eine Reduktase und CYP119 stammt aus einem thermophilen Organismus.

	aufgeklärt	Herkunft	Klasse	PDB-Code	membranständig	Hauptsubstrat
cam	1985	Bakt.	I	2CPP	nein	Campher
terp	1994	Bakt.	I	1CPT	nein	Terpineol
BM-3	1993	Bakt.	II	2HPD	nein	Fettsäuren
EryF	1995	Bakt.	I	1OXA	nein	Erythronolid B
CYP51	2000	Pilz	I	1E9X	nein	Lanosterol
CYP2C5	2000	Säuger	II	1DT6	ja	Progesteron
NOR	1997	Pilz	IV	1ROM	nein	NO
CYP119	2000	Bakt.	I	1F4T	nein	Stilben

^a cam: CYP101; terp: CYP108; BM-3: CYP 102; EryF: CYP107A1; NOR: CYP55

Wie in Tabelle 2.1 zu sehen ist, sind bisher hauptsächlich nicht-membranständige CYPs aufgeklärt. Es standen somit lange Zeit nur bakterielle Cytochrom-Strukturen zur Verfügung, denn nur die bakteriellen Cytochrome liegen im Cytosol gelöst vor. Sie sind daher der Strukturaufklärung durch (Röntgen-) Kristallographie leichter zugänglich.

Die Strukturaufklärung membrangebundener Proteine war lange nicht möglich, weil die Proteine beim Herauslösen aus der Membran ihre Struktur verlieren. Um trotzdem Informationen über membrangebundene Cytochrome zu erhalten, bediente man sich eines Tricks. Der membrangebundene Teil der Säugetier-Cytochrome besteht zum einen aus einem Membrananker (N-terminale Helix aus ca. 35 - 40 Aminosäuren) und zum anderen aus einem lipophilen Bereich am äußeren Rand des Proteins (Verbin-

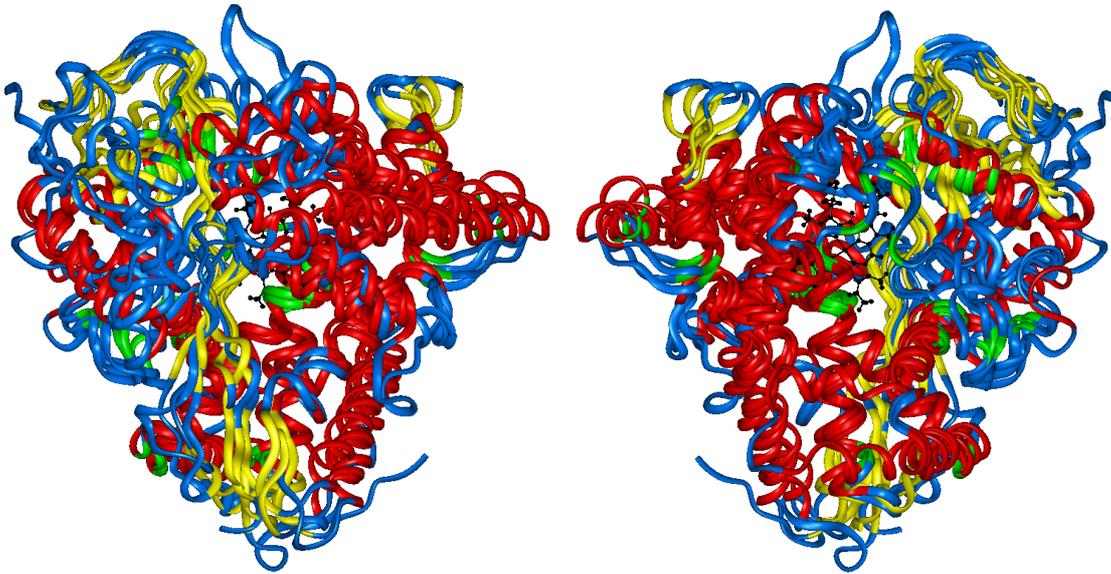
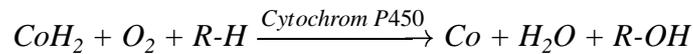


Abbildung 2.2: Überlagerung von vier Cytochrom-Kristallstrukturen (cam, terp, bm-3, eryF). Die Proteine sind mit der Häm-Gruppe (schwarz) überlagert (links: Aufsicht auf das Häm; rechts: Ansicht von der Rückseite). Grüne Aminosäuren sind über alle Cytochrome hinweg konserviert. Besonders diese konservierten Aminosäuren zeigen identische Positionen. Auch für Helices (rot) und Faltblätter (gelb) sind ähnliche räumliche Positionen erkennbar.

dungsloop von Helix F (HF) zu Helix G (HG)). Diese Seite taucht in die Membran ein (siehe Abb. 2.3). Um diese Proteine nun in Lösung zu bringen schneidet man den Membrananker ab, ersetzt in außen liegenden Bereichen einige hydrophobe Aminosäuren gegen hydrophile und exprimiert das Protein dann in seiner veränderten Form. Wie schwierig diese Technik ist, zeigt die Tatsache, dass bisher nur ein Cytochrom kristallisiert und aufgeklärt wurde, das ursprünglich membrangebunden war [17].

Neben den konservierten Bereichen, die die CYPs definieren, werden in der Struktur variable Sequenzabschnitte gefunden, die die Substratspezifität bedingen. Insbesondere Hasemann et al. und Gotoh haben diese Bereiche genau untersucht und sie SRS (Substrate Recognition Sites) genannt [19, 20]. Da Cytochrome ein sehr großes Spektrum an Substraten umsetzen können, müssen das aktive Zentrum und der Zugang zum aktiven Zentrum diese Variabilität widerspiegeln. So sind insgesamt sechs SRS um das aktive Zentrum herum gefunden worden, die durch ihre unterschiedliche

Wie schon in Kapitel 2.2 erwähnt läuft die Reaktion stöchiometrisch nach folgender Gleichung ab:



Das in Abb. 2.4 gezeigte Reaktions-Schema soll nachfolgend genauer erläutert werden.

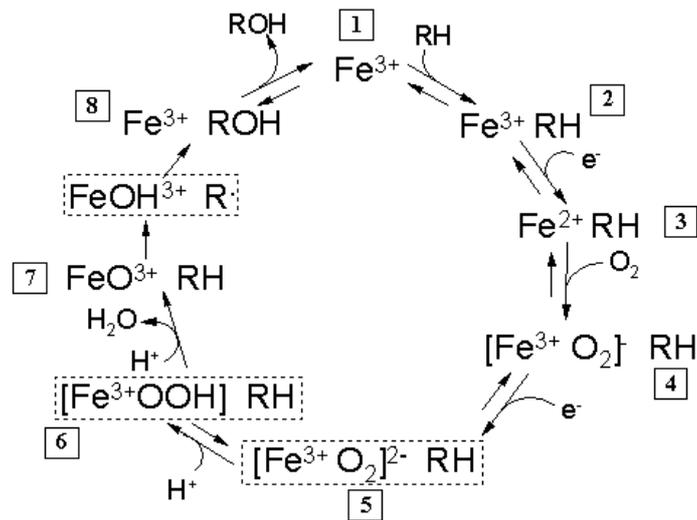


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Hydroxylierung durch Cytochrom P450 Systeme. Die umrahmten Übergangszustände konnten bisher experimentell noch nicht bestätigt werden. Weitere Erläuterungen siehe Kap. 2.5.

1. Im substratfreien Enzym liegt das Häm-Eisen dreiwertig vor. Es befindet sich im low-spin-Zustand, in dem die sechste Koordinationsstelle von einem Wassermolekül besetzt ist.
2. Durch Bindung eines Substrats (RH) im aktiven Zentrum wird das Wasser aus seiner Koordination verdrängt und das Häm-Eisen wechselt in den high-spin-Zustand. Die meist hydrophoben Substrate bewirken eine Veränderung in der Solvatisierung des gesamten aktiven Zentrums und damit eine Entropieveränderung.
3. Die Bindung des Substrats im aktiven Zentrum und der Wechsel des Häm-Eisens in den high-spin-Zustand erhöhen das Redox-Potential des Enzyms um ca. 100 mV.

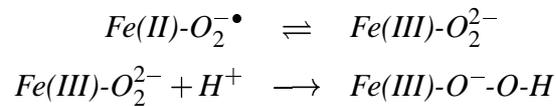
Erst diese Erhöhung ermöglicht die Aufnahme eines Elektrons, denn erst mit dem höheren Potential paßt das Enzym in den Potentialverlauf der bei der Monoxygenierung beteiligten Partner (siehe Tabelle 2.2). Es resultiert die Reduktion des dreiwertigen Häm-Eisens in den zweiwertigen Oxidationszustand.

Tabelle 2.2: Potential der bei der Umsetzung im Cytochrom-System beteiligten Partner [10]

bakterielles System	Potential [<i>mV</i>]	mikrosomales System	Potential [<i>mV</i>]
NADH	-320	NADPH	-324
↓		↓	
FAD	-290	FAD	-290
↓		↓	
Putidaredoxin	-240	FMN	-270
↓		↓	
CYP101 (o. Substrat)	-303	CYP2B4 (o. Substrat)	-300
↓		↓	
CYP101 (m. Substrat)	-173	CYP2B4 (m. Substrat)	-225
↓		↓	
$O_2/O_2^{\bullet-}$	-160	$O_2/O_2^{\bullet-}$	-160
↓		↓	
$O_2^{\bullet-}/O_2H^{\bullet}$	-100	$O_2^{\bullet-}/O_2H^{\bullet}$	-100

4. Das nun zweiwertige Häm-Eisen befindet sich noch immer im high-spin-Zustand und weist eine hohe Affinität für Sauerstoff auf. Es kommt zur Bindung von molekularem Sauerstoff, wobei das Häm-Eisen wieder in den low-spin-Zustand zurückkehrt.
5. Die nun folgende Aufnahme eines weiteren Elektrons ist die langsamste Reaktion in diesem Zyklus und somit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die Struktur des entstehenden Häm-Eisen-Sauerstoff-Komplexes ist dabei experimentell nicht bestätigt. Es werden verschiedene Übergangszustände diskutiert.
6. Nach Aufnahme eines Protons, das vermutlich über eine Kette von Wassermolekülen bis ins aktive Zentrum transportiert wird, entsteht wahrscheinlich eine

“Hydroperoxy”-Struktur



7. Die O-O-Bindung im “Hydroperoxy”-Komplex ist geschwächt, und es kommt relativ leicht zur Spaltung. Unter Beteiligung eines weiteren Protons entsteht Wasser. Das verbleibende Sauerstoff-Atom ist die reaktive Spezies der Monoxygenierungs-Reaktion. Die genaue Elektronenverteilung in diesem Häm-Eisen-Oxo-Komplex ist unbekannt, allerdings wurde kürzlich die Struktur des Komplexes aufgeklärt [21].
8. Man geht nun davon aus, dass in einer Art “Rebound-Mechanismus” der aktivierte Sauerstoff das Proton des Substrats radikalisch abspaltet und das gebildete “Hydroxy-Radikal” nach einer Drehung wieder an das Substrat bindet. Dadurch wird das Häm wieder in seinen ursprünglichen Zustand gebracht und nach Dissoziation des hydroxylierten Produkts aus dem aktiven Zentrum steht das Enzym für eine neue Reaktion zur Verfügung.

2.6 Wichtige Beispiele

In diesem Abschnitt sollen kurz die wichtigsten humanen Cytochrome erwähnt werden, die bei der Metabolisierung von Arzneimitteln und anderen Xenobiotika eine Rolle spielen.

2.6.1 CYP3A

Die beim Menschen vorkommenden Mitglieder der Cytochrom P450 3A-Unterfamilie sind CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7. Diese Enzyme sind die mit Abstand wichtigsten Cytochrome bei der Metabolisierung von Arzneistoffen. Hier ist besonders CYP3A4 herauszuheben, weil es bei allen Menschen in der Leber gefunden wird. CYP3A5 taucht nur bei etwa 25 % aller Erwachsenen in nachweisbarer Menge auf.

Mehr als 40 % aller Arzneistoffe sind Substrate von CYP3A4 und 3A5, deren Substratspektrum größtenteils identisch ist [22,23]. Gemeinsam liegt ihr Mengenanteil am Gesamtvorkommen von Cytochromen in der Leber bei etwa 50 %. CYP3A7 wurde bisher nur in der Leber von Föten gefunden [24,25] und spielt daher beim Metabolismus von Arzneistoffen keine Rolle.

CYP3A4 katalysiert unter anderem die Hydroxylierung von Diazepam, Midazolam, Ciclosporin, Cortisol, Testosteron und Progesteron und die Dealkylierung von Codein, Lidocain, Diltiazem, Verapamil und Erythromycin. Doch auch an der Aktivierung verschiedener Karzinogene ist CYP3A4 beteiligt (z.B. Aflatoxin B₁, 6-Aminochrysen, Senecionin, Benzo(a)pyren-7,8-diol [26,27]). Diese Karzinogene können allerdings auch von anderen Cytochromen aktiviert werden (besonders von CYPs der Familie 1). Um die Karzinogene zu aktivieren, müssen sie an einer bestimmten Position umgesetzt werden. CYP3A4 ist aber in der Lage Stoffe in mehr als einer Position umzusetzen. Durch Umsetzung in einer solchen nicht aktivierenden Position ist CYP3A4 auch an der Entgiftung der Substanzen beteiligt.

CYP3A4 tritt nicht nur in der Leber auf. Man findet es auch in der Darmwand und auch dort ist es metabolisch aktiv [23,28]. Die Menge an CYP3A4 in der Leber kann stark schwanken. So ist die Bildung von CYP3A4 durch synthetische Steroide wie Pregnenolon-16 α -carbonitril, Spironolacton, Dexamethason und andere endogene Glucocorticoide induzierbar. Desweiteren erhöhen Makrolid-Antibiotika wie Erythromycin oder Tranquillantien wie Phenobarbital und verwandte Substanzen den Anteil von CYP3A4 in der Leber.

Strukturell weist CYP3A4 einige Besonderheiten auf. Das aktive Zentrum scheint sehr groß zu sein, denn auch das voluminöse Makrolid-Antibiotikum Ciclosporin⁴ wird hier umgesetzt. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass im aktiven Zentrum von CYP3A4, abhängig von ihrer Größe, mehrere Substrat-Moleküle gleichzeitig gebunden werden können [29]. Diese Art der Kooperativität ist bei Cytochromen als natürliches Phänomen bislang nur für CYP3A4 beschrieben worden [30–32].

⁴Ciclosporin: Sandimmun[®], C₆₂H₁₁₁N₁₁O₁₂, M_r 1201

2.6.2 CYP2D6

CYP2D6 ist an der Verstoffwechslung von etwa 30 % aller Arzneistoffe beteiligt (z. B. Metoprolol, Propranolol, Codein, Imipramin, Metoclopramid) [33]. Da CYP2D6 nicht induzierbar ist und sein Anteil in der Leber nur 2 % der Gesamt-Cytochrommenge beträgt, macht sich ein Defekt im 2D6-abhängigen Metabolismus sehr stark bemerkbar (unerwünschte Akkumulation der Arzneistoffe im Körper). So sind etwa 5 - 10 % aller kaukasisch-stämmigen Menschen schlechte Metabolisierer des Antihypertonikums Debrisoquin⁵ [33,34]. Ein solcher Defekt tritt bei orientalisches-stämmigen Menschen mit einer Häufigkeit von unter 1 % auf [35]. Bei CYP2D6 gibt es also einen genetischen Polymorphismus zwischen ethno-geographischen Gruppen. Bei den sogenannten „schlechten Metabolisierern“ werden verschiedene Mutationen im *CYP2D6*-Gen gefunden, darunter Basenpaar-Deletionen, Punktmutationen und auch Deletionen des gesamten Gens [36,37]. Neben den „schlechten Metabolisierern“ wurde auch eine Gruppe von „extrem schnellen Metabolisierern“ gefunden [38,39]. Diese Menschen verfügen über mehrere Kopien des *CYP2D6*-Gens.

CYP2D6 katalysiert viele aliphatische und aromatische Hydroxylierungen und O-Dealkylierungen. Alle Substrate für CYP2D6 verfügen über eine bei physiologischem pH-Wert protonierte Stickstoff-Funktion und werden in einem hydrophoben Bereich umgesetzt, der sich im Abstand von 5 bis 7 Å zum protonierten Stickstoff befindet. Substanzen, bei denen dieser hydrophobe Bereich mit einer wasserstoffbrücken-akzeptierenden/donierenden Funktion (meist einer Hydroxyl-Gruppe) besetzt ist, wirken als Inhibitor auf CYP2D6.

2.6.3 CYP2C

Aus der CYP2C-Familie kommen beim Menschen CYP2C9 und CYP2C19 vor. Ihr Anteil an der Gesamtcytochrommenge in der Leber beträgt etwa 20 %. Diese Enzyme sind in der Lage, ca. 15 % aller Arzneistoffe umzusetzen [40].

Diese beiden Enzyme sind die wichtigsten metabolisierenden Enzyme von Barbituraten und Hydantoin-Derivaten. Außerdem gehören auch einige nicht-steroidale

⁵Debrisoquinsulfat: Declinax[®] in Großbritannien und Kanada im Handel.

Anti-Rheumatika (NSAR) zu den Substraten von CYP2C9 (z. B. Diclofenac, Tenoxicam, Ibuprofen, Acetylsalicylsäure). Zu den bekannten Substraten von CYP2C19 gehören neben anderen auch Omeprazol, Diazepam, Propranolol, Proguanil und Imipramin [41, 42], wobei diese Stoffe auch von anderen CYPs umgesetzt werden. Die bevorzugte katalysierte Umsetzung ist die Hydroxylierung von sowohl aromatischen als auch aliphatischen Kohlenstoffen. CYP2C-Enzyme sind durch Phenobarbital induzierbar, wenn auch schwächer als die Mitglieder anderer CYP2-Subfamilien.

Zwischen 3 und 5 % der kaukasischen und ca. 20 % der orientalischen Bevölkerung sind schlechte Metabolisierer von Mephenytoin (N-Methyl-Phenytoin) [37, 43–45]. Auch hier liegt der Grund in einem Polymorphismus, der im *CYP2C19*-Gen auftritt. Dieser Defekt führt zu einem CYP2C19PM-Enzym⁶, dessen Auftreten in Kombination mit positiven Hepatitis-C-Serumtestwerten zu einem stark erhöhten Risiko für die Entwicklung von Leberzellkrebs führt [46].

2.6.4 CYP1A

Die wichtigsten Vertreter aus der kleinen CYP1A-Unterfamilie sind CYP1A1 und CYP1A2. Diese beiden Enzyme finden sich bei allen höheren Landbewohnern. Viele Fischarten verfügen nur über CYP1A1. Ebenso wie bei der Aufteilung der Unterfamilie 2, steht auch hier zu vermuten, dass sich die Aufteilung in CYP1A1 und 1A2 erst nach der Besiedlung von Landmassen ereignet hat. Die Ausbildung der CYP1A2-Unterfamilie ist demnach eine Anpassungsreaktion auf die geänderten Lebensumstände der Tiere an Land (vergl. Kap. 2.1).

Beide Enzyme zeigen eine weitgehende Übereinstimmung ihrer Substratspezifität. Beide zeigen eine Vorliebe für polycyclische-aromatische Verbindungen, die weitgehend planar sind, wobei CYP1A1 neutrale polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe und CYP1A2 polyaromatische und heterocyclische Amine und Amide bevorzugt [47]. In der Leber dominiert der Subtyp CYP1A2. CYP1A1 tritt fast ausschließlich extra-hepatisch auf (besonders in Lunge und Plazenta [48, 49]). Die in Zigarettenrauch auftretenden polycyclischen Verbindungen (wie Benzo[a]pyren, u. a.) sind fast alle Prokarzinogene und induzieren die Bildung von CYP1A1 in der Lunge [50].

⁶PM = Poor Metaboliser

Durch CYP1A1 werden viele dieser Substanzen zu Karzinogenen und Mutagenen aktiviert. Es wird daher ein Zusammenhang vermutet zwischen der individuellen Aktivität von CYP1A1 und dem Risiko Lungenkrebs durch Rauchen auszubilden.

CYP1A2 setzt in der Leber auch Arzneistoffe um. Hier sind besonders die Xanthine Coffein und Theophyllin zu erwähnen, die spezifisch von CYP1A2 umgesetzt werden [51, 52]. Besonders auf Grund der kleinen therapeutischen Breite sind bei gleichzeitiger Gabe von Theophyllin und einem Inhibitor von CYP1A2 (z. B. Fluvoxamin) hohe Theophyllin-Spiegel und somit starke unerwünschte Wirkungen des Theophyllins zu erwarten.

2.6.5 CYP2E1

CYP2E1 ist die Bezeichnung für die hoch-homologen Enzyme von Mensch, Ratte, Maus und Kaninchen (wobei es sich beim Kaninchen um 2 Enzyme (CYP2E1 und 2E2) zu handeln scheint) [53]. Es wurde hier keine Aufspaltung in der Nomenklatur für die verschiedenen Spezies vorgenommen. Das aktive Zentrum von CYP2E1 ist klein, alle Substrate haben einen maximalen Durchmesser von 6,5 Å. Bekanntestes Beispiel eines CYP2E1-Substrats ist Ethanol. Es werden aber auch andere kurzkettige Alkohole und Carbonylverbindungen (z.B. Butanol, Pentanol, Ethanal, Methyl-t-butylketon), Ether (Diethylether) und einfache Kohlenwasserstoffe (Benzen, Toluol, Ethan, Hexan) umgesetzt. Halogenierte Substrate werden häufig reaktiv dehalogeniert (z.B. Chloroform, Vinylchlorid, Vinylbromid, Methylchlorid) [40]. Dabei können nach Koppelung an Cystein und nachfolgende Spaltung durch β -Lyase Säurehalogenide entstehen, die hohe karzinogene Potenz aufweisen. Andere halogenierte Arzneistoffe, die nicht reaktiv dehalogeniert werden, (z. B. Halothan) werden umgesetzt zu hepatotoxischen Produkten. Aus einigen weiteren halogenhaltigen Stoffen (z. B. Enfluran, Methoxyfluran) resultieren ungiftige, gut ausscheidbare Produkte.

Viele einfache Heterozyklen sind zugleich Substrat und Induktor von CYP2E1 (Imidazol, Pyrazol, Pyridin) [54]. Auch Ethanol fällt in diese Gruppe, wobei dessen Umsetzungsprodukt selbst wieder hepatotoxisch ist. Nur 1-2 % aller Arzneistoffe sind Substrate für CYP2E1. Darunter sind allerdings so bekannte wie Paracetamol und Isoniazid [40].

2.6.6 CYP2A

Aus der CYP2A-Familie findet man beim Menschen 3 Gene. Diese kodieren für die Cytochrome CYP2A6, 2A7 und 2A13. Die Identität dieser drei Enzyme untereinander liegt bei jeweils über 90 %. CYP2A7 liegt in der Leber in vergleichbarer Menge vor wie CYP2A6, obwohl es einen Defekt aufweist (vgl. Kapitel 2.4). Seine eventuell vorhandenen katalytischen Aktivitäten sind derzeit noch unklar.

CYP2A13 wird in der Leber nur in sehr geringem Ausmaß produziert. Hier ist CYP2A6 die katalytisch dominierende Variante. In anderen Organen wie der Lunge oder der Nasenschleimhaut überwiegt der Anteil an CYP2A13 [55]. Die Substratspektren von CYP2A6 und 2A13 sind sehr ähnlich, wobei es bei einzelnen Substanzen kleine Unterschiede gibt. So wird das in Tabakrauch enthaltene Prokarzinogen NNK⁷ von CYP2A13 besser zum aktiven Karzinogen umgesetzt als von CYP2A6 [56]. Da CYP2A13 in Lunge und Nasenschleimhaut auftritt, kann man vermuten, dass das erhöhte Krebsrisiko von Rauchern unter anderem auf die Aktivität von CYP2A13 zurückzuführen ist.

Bei der Gesamtbetrachtung der Metabolisierung von Arzneistoffen beim Menschen spielt CYP2A6 nur eine untergeordnete Rolle. Allerdings spielen sowohl CYP2A6 als auch CYP2A5, das Analogon zu 2A6 aus der Maus, eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von häufig vorkommenden Karzinogenen (vgl. Kap. 3.2.1). Außerdem scheint CYP2A6 das einzige Leberenzym beim Menschen zu sein, das Nicotin abbaut [57]. Diese Umstände haben dazu geführt, dass sich diese Arbeit mit diesen Cytochromen beschäftigt. Es entstanden Modelle der beiden Enzyme, welche in Kapitel 3 ausführlich vorgestellt werden.

⁷NNK: 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon

Kapitel 3

Cytochrom P450 2A

3.1 Vorkommen und Funktion

Enzyme aus der CYP2A-Unterfamilie kommen in allen Säugetieren vor. Zur Zeit besteht die Unterfamilie aus 22 Mitgliedern (darunter 2 Pseudoproteine). Sie ist damit eine der größten Unterfamilien der Cytochrome. Eine Auflistung aller Familienmitglieder befindet sich in Tabelle 3.1. Die Tabelle zeigt sowohl die Spezies als auch die Hauptsubstrate, soweit diese bekannt sind.

Betrachtet man die Enzyme der CYP2A-Familie fällt auf, dass man zwei Hauptgruppen bilden kann. Es gibt eine Gruppe, deren Substrate in der Hauptsache endogene Steroide sind und eine andere, die Xenobiotika metabolisiert. Beim genaueren Vergleich der Sequenz der Enzyme bestätigt sich diese Einteilung. Es zeigt sich dabei, dass trotz der großen Familienähnlichkeit entscheidende Unterschiede in den SRS-Regionen auftreten (vgl. Kap. 2.4). Vier Aminosäuren entscheiden, durch ihren Typ über die Substratspezifität der einzelnen Enzyme (s. Abb. 3.1, [9]).

Ausschlaggebend für die Einteilung in die beiden Gruppen ist der Typ der Aminosäure in Position 209. Steht an dieser Position ein Phenylalanin (F), ist das Enzym nicht in der Lage, natürliche Steroide (wie Testosteron) umzusetzen. Diese Enzyme metabolisieren Xenobiotika und werden durch die Umsetzung von Cumarin charakterisiert. Neben der Metabolisierung von Xenobiotika sind sie entscheidend an der Aktivierung von verschiedenen Prokarzinogenen beteiligt. Es wurden dabei in Stu-

Tabelle 3.1: Übersicht über alle bekannten CYP2A-Enzyme [58]. Für CYP2A19 besteht noch kein Eintrag in den Datenbanken. Bei Einträgen ohne spezifiziertes Substrat wurde bisher nur die Sequenz geklärt und funktionelle Tests stehen noch aus. (^a= SWISS-PROT/ TrEMBL / GenEMBL)

	Spezies	Zugriffscod ^a	Hauptsubstrate
CYP2A1	Ratte	P11711	Testosteron (7 α -OH)
CYP2A2	Ratte	P15149	Testosteron (15 α -OH)
CYP2A3	Ratte	P20812	Cumarin (7-OH)
CYP2A4	Maus	P15392	Testosteron (15 α -OH)
CYP2A5	Maus	P20852	Cumarin (7-OH)
CYP2A6	Mensch	P11509	Cumarin (7-OH)
CYP2A7	Mensch	P20853	inaktiv
CYP2A8	Goldhamster	P24454	Cumarin (7-OH)
CYP2A9	Goldhamster	P24455	Testosteron (7 α -OH)
CYP2A10	Kaninchen	Q05555	Cumarin (7-OH)
CYP2A11	Kaninchen	Q05556	?
CYP2A12	Maus	P56593	Testosteron (7 α -OH)
CYP2A13	Mensch	Q16696	?
CYP2A14	chin. Hamster	Q9Y1H8	?
CYP2A15	chin. Hamster	Q9R0R6	?
CYP2A16	Goldhamster	Q9QY50	?
CYP2A17	chin. Hamster	Q9JM91	?
CYP2A18PC	Mensch (Pseudogen)	AC008537	?
CYP2A18PN	Mensch (Pseudogen)	U22030	?
CYP2A19	Schwein	—	?
P450F1	Pavian	P80055	Cumarin (7-OH)
P450CMLd	Cynomolgus-Affe	Q9TRB8	Cumarin (7-OH)

dien folgende Prokarzinogene durch aufgereinigte bzw. rekombinante Enzyme aktiviert: Aflatoxin B₁ durch 2A5 [59], 2A6 [26], 2A8 [60, 61] und 2A10 [62]; NNK⁸ und NDEA⁹ durch 2A6 [63, 64] und 2A10 [65, 66]; 1,3-Butadien durch 2A6 [67]. Es sind bisher noch keine endogenen Substrate für diese Untergruppe innerhalb der 2A-Familie bekannt. Charakteristisch für diese Untergruppe ist das konservierte Auftreten der Aminosäuren Valin, Phenylalanin und Alanin in den Positionen 117, 209 und 481.

⁸NNK: 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon

⁹NDEA: N-Nitroso-diethylamin

SRS:	1	—	2	—	5	—	6
Position:	117	/	209	/	365	/	481
2A1	A	/	N	/	P	/	T
2A9	A	/	N	/	P	/	S
2A12	A	/	N	/	F	/	T
2A2	S	/	N	/	P	/	T
2A5	V	/	F	/	M	/	A
2A6	V	/	F	/	V	/	A
2A8	V	/	F	/	V	/	A
2A10	V	/	F	/	M	/	A
2A3	A	/	F	/	M	/	V
2A4	A	/	L	/	L	/	V
2A7	A	/	F	/	M	/	A
2A11	A	/	F	/	M	/	A

Abbildung 3.1: Vergleich der vier Schlüssel-Aminosäuren der CYP2A-Familie

Die beiden anderen natürlich auftretenden Variationen in Position 209, Asparagin (N) und Leucin (L), führen zu Enzymen, die durch Steroid-Abbau charakterisiert werden. Diese Gruppe kann noch weiter unterteilt werden. Entscheidend hierfür ist die Position des Steroid-Grundgerüsts, in der die Hydroxylierung stattfindet. Die verwendete Standard-Testsubstanz ist Testosteron und die Umsetzung erfolgt entweder in Position 7 oder 15 des Steroid-Gerüsts (Abb. 3.2).

Da beide Untergruppen Steroide als Substrat akzeptieren, müssen die drei anderen variablen Aminosäuren für die Regioselektivität verantwortlich sein (Abb. 3.1). So wird Testosteron von CYP2A1 [68], 2A9 [60, 69] und 2A12 [70] in Position 7 umgesetzt. Diesen Enzymen gemeinsam sind Asparagin in Position 209 und Alanin in Position 117. Auch CYP2A2 trägt ein Asparagin in Position 209, allerdings ein Serin in Position 117. Als Folge setzt es Testosteron in Position 15 um [68]. Die Mutation an Position 117 bedingt also eine leichte Umorientierung des Substrats im aktiven Zentrum, so dass Position 15 zur Hydroxylierungsposition wird.

Dass nicht nur Position 117 einen zusätzlichen Einfluss auf die Orientierung des Substrates hat, zeigt CYP2A4. Auch CYP2A4 setzt Testosteron in Position 15 um [71], trägt aber, wie CYP2A1, 2A9 und 2A12, ein Alanin in Position 117. Die anderen

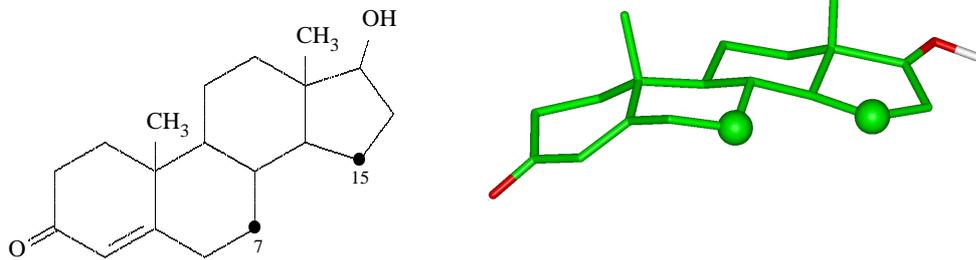


Abbildung 3.2: Links: Strukturformel von Testosteron mit Kennzeichnung der Positionen 7 und 15; rechts: räumliche Darstellung von Testosteron (Positionen 7 und 15 als Kugeln). Es sind nur die essentiellen Wasserstoffatome dargestellt.

Schlüssel-Aminosäuren zeigen mit L365 und V481 neue Variationen, die gemeinsam mit L209 für die unterschiedliche Positionierung des Testosterons im aktiven Zentrum verantwortlich sind.

Die Substratspezifität ist also extrem empfindlich auf die exakte Anordnung der Aminosäuren im aktiven Zentrum. Daher wird im folgenden Kapitel detailliert auf CYP2A5 und CYP2A6 eingegangen, um diesen Mechanismus genauer zu verstehen.

3.2 Was wir bisher über CYP2A5/6 wissen

Die Cytochrome 2A5 und 2A6, aus der Maus bzw. dem Menschen, wurden experimentell schon ausführlich untersucht, insbesondere in den Arbeitsgruppen um Hannu Raunio¹⁰ und Masahiko Negishi¹¹. In diesem Kapitel soll der aktuelle Wissensstand präsentiert werden. Es wird ein Überblick gegeben über Mutationsstudien, *in vivo* Untersuchungen, sowie Studien über den Regulierungsmechanismus. Auch bisher aufgestellte Computermodelle, die auf bekannten Liganden beruhen, werden kurz vorgestellt.

¹⁰Department of Pharmacology and Toxicology, University of Oulu, Oulu, Finland

¹¹Pharmacogenetics Section, Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, North Carolina, USA

3.2.1 Liganden

CYP2A6 Es wurden bis jetzt noch keine endogenen Substrate von CYP2A6 gefunden. Das bekannteste exogene Substrat ist Cumarin, das beim Menschen ausschließlich von CYP2A6 umgesetzt wird [57]. Die Umsetzung von Cumarin zu 7-Hydroxycumarin wird daher auch als sehr spezifische Probe für die Aktivität von CYP2A6 *in vitro* und *in vivo* genutzt. So werden *in vitro* Inhibitionskonstanten für andere Stoffe gewonnen, indem man die Inhibition der Cumarin-7-Hydroxylierung misst. Durch seine relative Ungiftigkeit eignet sich Cumarin auch für *in vivo* Experimente und bei Phänotypisierungs-Studien. Neben Cumarin existieren noch einige andere wichtige Substrate von CYP2A6, die wichtigsten werden in Tabelle 3.2 vorgestellt.

Tabelle 3.2: Übersicht über die wichtigsten Substrate von CYP2A6 mit Angabe der Bedeutung von CYP2A6 für ihre Metabolisierung (nach [57])

Substanz	katalysierte Reaktion	geschätzter Anteil von CYP2A6 (andere beteiligte CYPs)
Cumarin	7-Hydroxylierung	100%
7-Ethoxy-Cumarin	O-Deethylierung	klein (CYP2E1, u. a.)
Methoxyfluran	Dehalogenierung	
Halothan	Reduktion	
SM-12502 ^a	S-Oxidation	überwiegend
Losigamon	Oxidation	
Valproinsäure	Aktivierung	klein (CYP2C9)
Nicotin	3'-Hydroxylierung	100 % (niedrige Konzentrationen)
NNK ^a	4-Hydroxylierung	klein (CYP2E1)
NDEA ^a	N-Dealkylierung	groß (CYP2E1)
MNAN ^a	Depentylierung	groß (CYP2E1)
AFB1 ^a	8,9-Epoxidierung	klein (CYP1A2; CYP3A4)
MOCA ^a	N-Oxidation	klein
1,3-Butadien	Epoxid-Bildung	
Chinolin	1-Oxidation	
3-Methylindol	Methylenimin-Bildung	
DCBN ^a	Aktivierung	groß (CYP2E1)

^a SM-12502: 3,5-Dimethyl-2-(3-pyridyl)-thiazolidin-4-on-hydrochlorid; NNK: 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon; NDEA: N-Nitroso-diethylamin; MNAN: Methyl-N-amylnitrosamin; AFB1: Aflatoxin B₁; MOCA: 4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin); DCBN: 2,6-Dichlorbenzonnitril.

Auf Grund seiner großen Verbreitung ist Nicotin aus dieser Liste besonders hervorzuheben. Die Umsetzung von Nicotin zu Cotinin durch C-Oxidation wird durch

CYP2A6 katalysiert [72]. Auch die nachfolgende 3'-Hydroxylierung von Cotinin ist größtenteils CYP2A6-abhängig. CYP2A6 ist bei geringen Nicotin-Konzentrationen das einzige Cytochrom im Menschen, das Nicotin metabolisiert. Da Nicotin für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Sucht beim Rauchen verantwortlich gemacht wird, können inter-individuelle genetische Unterschiede der CYP2A6-Aktivität Auswirkung auf das Verhalten von Rauchern haben [73].

Tabelle 3.2 enthält auch noch eine Reihe toxikologisch interessanter Substanzen. Darunter sind Karzinogene wie einige Nitrosamine, Aflatoxin B₁ und einige Pharmaka wie Halothan und Valproinsäure.

CYP2A5 Die Datenlage für CYP2A5 ist nicht vergleichbar mit der für CYP2A6. Die menschliche Variante wurde hinsichtlich ihrer Liganden wesentlich ausführlicher untersucht als die der Maus. Es herrscht trotzdem Einigkeit darüber, dass die Substratspezifität beider Enzyme gleich ist und nur die Regioselektivität sowie die Geschwindigkeit der Umsetzung bei einzelnen Substraten variieren können. So wird zwar Cumarin von beiden Isoenzymen gleich gut umgesetzt, 7-Ethoxy-Cumarin dagegen von 2A5 wesentlich schneller als von 2A6 [74]. Tabelle 3.2 besitzt im Wesentlichen auch für CYP2A5 Gültigkeit.

3.2.2 Regulierung

CYP2A5 Es sind verschiedene Stoffe bekannt, die die Aktivität von CYP2A5 induzieren (z. B. Phenobarbital und verwandte Antiepileptika, Rifampicin sowie Pyrazol). Die erhöhte Aktivität durch Phenobarbital ist auf eine verstärkte Expression von CYP2A5 durch eine vermehrte Transkription des *CYP2A5*-Gens zurückzuführen [75, 76]. Pyrazol wirkt durch eine Stabilisierung vorhandener mRNA [77–79] aktivitätssteigernd.

Interessant an CYP2A5 ist auch, dass es einem zirkadianen Rhythmus unterliegt. Da bisher noch keine endogenen Liganden von CYP2A5 bekannt sind, liegt die Vermutung nahe, dass dieses Enzym nur der Verarbeitung von Xenobiotika dient, die vermehrt mit der Nahrung aufgenommen werden. Da Mäuse nachtaktiv sind ist die Produktion und damit die Aktivität von nahrungsverarbeitenden Enzymen nachts messbar

größer als tagsüber. Das gilt auch für die Aktivität von CYP2A5. Es wird im Gegensatz zu vielen anderen CYPs, durch cAMP¹² induziert [75, 80], das bei Säugern den zirkadianen Rhythmus durch nächtliche Erhöhung der Melatonin-Synthese in der Zirbeldrüse steuert [81]. Das cAMP dient hier als entscheidender Signaltransduktor. Die direkte Koppelung der CYP2A5-Produktion an diesen Steuerungsmechanismus ermöglicht die einfache und direkte Koordinierung dieser Prozesse. Die verstärkte CYP2A5-Expression durch cAMP kann durch gleichzeitige Gabe von Phenobarbital noch gesteigert werden, was auf unabhängige Mechanismen hindeutet [75].

Für die Maus wurden erst wenige Studien zur Identifizierung von Inhibitoren durchgeführt. Allerdings ist bekannt, dass sowohl 8-Methoxypsoralen als auch Pilocarpin CYP2A5 in seiner Aktivität hemmen [82, 83].

CYP2A6 Die genaue Regulierung der beiden Isoenzyme auf molekularer Ebene ist für CYP2A5 zwar besser untersucht als für 2A6, die bei CYP2A5 zu Grunde liegenden Mechanismen werden aber auch für 2A6 angenommen. In Studien über die Induzierbarkeit von CYP2A6 wurde zumindest für Phenobarbital und Rifampicin gezeigt, dass sie CYP2A6 induzieren [84]. Auch für andere Antiepileptika existieren Hinweise für eine Induktion der CYP2A6-Aktivität [85]. Ebenso scheinen Pyrazol und Griseofulvin die 7-Hydroxylierung von Cumarin zu induzieren.

Neben den Induktoren gibt es auch einige spezifische und unspezifische Inhibitoren von CYP2A6. Da in den Studien meist keine direkten Messungen zu einer eventuellen Umsetzung der „potentiellen Inhibitoren“ vorgenommen wurden, dient die Inhibition der Umsetzung von Cumarin als Entscheidungskriterium für die Klassifizierung als Inhibitor. Es ist daher meist nicht bekannt, ob nicht einige „CYP2A6-Inhibitoren“ selbst Substrate des Enzyms sind oder wirklich als reine kompetitive Inhibitoren zu Cumarin fungieren.

Zu den bekannten eher unspezifischen Inhibitoren, die auf mehrere CYPs wirken, zählen antimykotisch wirksame Azol-Derivate wie Miconazol und Ketoconazol sowie Substanzen wie Metyrapon und Tranylcypromin. CYP2A6-spezifische Inhibitoren *in vitro* sind z. B. Pilocarpin und 8-Methoxypsoralen, die kompetitiv an das Häm-

¹²cAMP: cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat

Eisen von CYP2A6 binden bzw. den Umsetzungsmechanismus in CYP2A6 unterbrechen [82, 83, 86, 87].

3.2.3 Mutationen

CYP2A6 In mehreren *in vivo* Phänotypisierungsstudien wurde festgestellt, dass auch beim *CYP2A6*-Gen polymorphe Formen vorkommen. Es handelt sich dabei zum einen um Mutationen einzelner Basen, die zum Austausch einzelner Aminosäuren führen, zum anderen aber auch um Mutationen in mehreren Positionen in verschiedenen kodierenden Regionen des *CYP2A6*-Gens [88–90]. Bisher sind drei Varianten des Cytochroms P450 2A6 bekannt, die eine Punktmutation aufweisen und eine Variante, die über mehrere Punktmutationen verfügt (siehe Tabelle 3.3). Neben diesen Punktmutationen existieren auch mindestens vier Varianten, bei denen Deletionen größerer Genbereiche auftreten oder sogar das gesamte Gen fehlt (*CYP2A6*4A-D*) [89, 91, 92]. Solche Mutationen und Deletionen können die Folge von cross-over Ereignissen sein. So führt z.B. ein cross-over zwischen *CYP2A6*- und *2A7*-Gen zu *CYP2A6*4D*, einem ungleichmäßigen Hybrid, das ein nicht funktionsfähiges Protein kodiert.

Tabelle 3.3: Übersicht über die Aktivität der aus den polymorphen *CYP2A6* Genen abgeleiteten natürlichen Mutanten

Name	Typ	Aktivität
<i>CYP2A6*1</i>	Wildtyp	Cumarin-7-Hydroxylierung
<i>CYP2A6*2</i>	L160H	Cumarin-3-Hydroxylierung (geringere Aktivität)
<i>CYP2A6*3</i>	mehrere Mutationen	inaktiv
<i>CYP2A6*4A-D</i>	Deletion großer Genbereiche	inaktiv
<i>CYP2A6*5</i>	G479L	inaktiv
<i>CYP2A6*6</i>	R128Q	geringere Aktivität (durch verringerten Häm-Einbau)

Die Häufigkeit des Auftretens dieser Polymorphismen wird in der Literatur kontrovers diskutiert [25, 93, 94]. So wurde nach anfänglich angenommenem häufigem Auftreten von *CYP2A6*2*-Allelen in der chinesischen Bevölkerung [95] bei neueren empfindlicheren Untersuchungen diese Variante gar nicht mehr entdeckt [96]. In derselben Untersuchung konnte auch festgestellt werden, dass ca. 15 % aller Chinesen eine De-

letion des *CYP2A6*-Gens aufweisen. Um die Bedeutung dieser Polymorphismen für Raucher abschätzen zu können, sind noch eingehende weitere Untersuchungen nötig (s. auch Kap. 3.2.1).

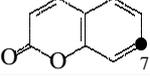
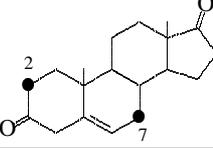
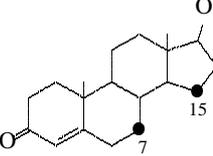
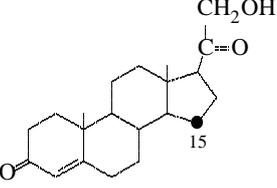
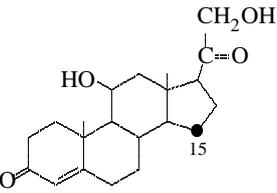
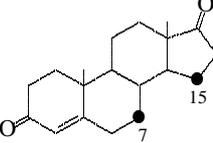
CYP2A5 Für dieses Enzym wurden bisher keine Untersuchungen über Polymorphismen durchgeführt. Dafür wurde CYP2A5 mit dem Isoenzym der Ratte (CYP2A4) verglichen, das sich in nur 11 Positionen von CYP2A5 unterscheidet [1]. Die beiden Enzyme weisen trotz ihrer hohen Sequenzidentität unterschiedliche Substratspezifitäten auf. Während CYP2A5 eine Cumarin-Hydroxylase ist, setzt CYP2A4 Steroide (z. B. Testosteron in Position 15) um. Nachdem in Mutationsexperimenten alle 11 unterschiedlichen Aminosäuren gegeneinander ausgetauscht wurden, zeigte sich, dass nur drei Aminosäuren Einfluß auf die Substratspezifität der Enzyme haben (Val117, Phe209, Met365; Bezeichnung nach Vorkommen in CYP2A5). Die anderen Mutationen sind diskret und haben offensichtlich keinen Einfluß auf das aktive Zentrum [71]. Eine Tripel-Mutante von CYP2A5 mit den Mutationen V117A, F209L und M365L¹³, bei der die drei Positionen mit den entsprechenden Aminosäuren aus CYP2A4 besetzt sind, verliert die Fähigkeit zur Cumarin-Umsetzung von CYP2A5 fast völlig und zeigt die Substratspezifität von CYP2A4.

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass noch eine vierte Aminosäure (Ala481) in Kombination mit einer Mutation in Position 209 (F209N) die Regioselektivität von CYP2A5 beeinflusst. So wurde beobachtet, dass eine F209N-Mutante von CYP2A5 Androstendion in den Positionen 7 α und 15 α gleich gut umsetzt. Eine zusätzliche A481V-Mutation ändert die Regiospezifität und Androstendion wird nur noch in Position 15 α umgesetzt [97]. Tabelle 3.4 gibt einen Überblick über die substratbestimmenden Aminosäuren von CYP2A5 und ihren Einfluß auf die Spezifität.

Man erkennt in Tabelle 3.4, dass der Typ der Aminosäure in Position 209 eine entscheidende Rolle für die Substratauswahl spielt (vgl. auch Kap. 3.1). Durch Mutation des an dieser Position natürlich vorkommenden Phenylalanins in eine kleinere Aminosäure (z.B. Leucin) wird das aktive Zentrum so vergrößert, dass nun auch Steroide wie Deoxycorticosteron umgesetzt werden können. Corticosteron unterscheidet sich von

¹³V117A: Abkürzung für eine Mutation bei der Valin (V) in Position 117 im Wildtyp gegen Alanin (A) in der Mutante ausgetauscht ist.

Tabelle 3.4: Einfluss der substratbestimmenden Aminosäuren auf die Umsetzung ausgewählter Substrate von CYP2A5. (WT = Wildtyp)

Position	Aminosäure	Substrat	Hydroxylierung in Pos. (Rate in $\frac{nmol}{min \cdot nmol(P450)}$)	Quelle
117	Val (WT)		7 (2,9)	[98]
	Ala		7 (0,3)	
117	Val (WT)		2 α	[98]
	Ala		7 β	
209	Phe (WT)		7 α : 15 α = 1 : 9	[99]
	Leu		7 α : 15 α = 1 : 20	
209	Phe (WT)		15 α (0,1)	[100]
	Leu		15 α (16)	
	Asn		15 α (8)	
209	Phe (WT)		keine Umsetzung	[100]
	Leu		keine Umsetzung	
	Asn		15 α (16)	
209 / 481	Asn/Ala (WT)		7 α : 15 α = 1 : 2	[97]
	Asn/Val		7 α : 15 α = 1 : 100	
	Asn/Ile		7 α : 15 α = 1 : 400	

Deoxycorticosteron durch eine zusätzliche Hydroxyl-Funktion und wird nur von einer Mutante umgesetzt, bei der das Phenylalanin durch ein Asparagin ersetzt ist [101].

Eine Mutation in Position 481 macht sich nur bemerkbar, wenn gleichzeitig die Position 209 verändert ist. Auch dies deutet darauf hin, dass Position 209 eine zentrale Rolle zukommt und erst nach Verkleinerung (hier F209N) dieser Aminosäure die Seitenkette in Position 481 Kontakt zum aktiven Zentrum bekommt.

Um die zentrale Position von Aminosäure 209 noch weiter zu untersuchen, wurde ein in der Nähe liegendes Glycin (G207) zu Prolin mutiert. Diese Mutation führte zu einer geringeren Aktivität gegenüber Cumarin und zu einer erhöhten Affinität gegenüber Testosteron [99]. Trotzdem wird Testosteron von der G207P-Mutante nicht metabolisiert. Eine Erklärung könnte sein, dass Prolin durch seine eingeschränkte konformatorische Beweglichkeit, zu räumlichen Veränderungen im aktiven Zentrum führt und durch seine Nähe zur zentralen Aminosäure 209 deren Neupositionierung bewirkt. Im aktiven Zentrum könnte so mehr Raum für große Substrate geschaffen werden.

3.2.4 Computermodelle

Bei den bisher veröffentlichten Computermodellen von CYP2A6 muss man zwei Typen unterscheiden. Zum einen die Modelle, in denen das komplette Enzym mit Hilfe der Homologie-Modellierung aufgebaut wurde, zum anderen Modelle, die auf Auswertung der Eigenschaften der Liganden beruhen.

Homologie-Modelle Die erstgenannten Modelle sind in der Arbeitsgruppe um David Lewis¹⁴ entstanden. Es wurden dort mehrere Modelle von CYP2A-Familienmitgliedern erstellt und publiziert [102, 103]. In beiden Artikeln diente die Kristallstruktur von CYP102 (auch P450_{BM-3} genannt) als Schablone zum Aufbau des Modells. Die Veröffentlichung einer CYP102-Kristallstruktur [104] mit gebundenem Substrat (Palmitoleinsäure) ermöglichte im zweiten Artikel eine verbesserte, an der Position der Palmitoleinsäure orientierte Positionierung der Substrate im CYP2A6-Modell. In beiden Fällen wurde nach dem Alignment der Sequenzen und dem Bau des Modells eine Energieminimierung der Struktur durchgeführt (um unerwünschte Kontakte und

¹⁴School of Biological Sciences, University of Surrey, Guildford, Surrey, GU2 5XH, UK

somit entstehende hohe Energiewerte zu verringern). In diese minimierten Strukturen wurden die Substrate von Hand eingedockt und die entstehenden Komplexe wiederum energieminimiert. Folgende Aminosäuren sind nach diesen Veröffentlichungen besonders wichtig für die Bindung und Orientierung der verschiedenen Substrate im aktiven Zentrum: Gln104, Asp108, Val117, Phe209, Ile298, Val365, Ile366, His477 und Val478 (Benennung nach der CYP2A6-Sequenz). Es fällt auf, dass die drei wichtigen Aminosäuren (117, 209 und 365) in dieser Aufzählung Erwähnung finden. Sie sind also in diesen Modellen im aktiven Zentrum zu finden. Die vierte wichtige Aminosäure 481 spielt, in Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen, erst nach Mutation von F209 zu Leucin oder Asparagin eine wichtige Rolle. Da beim CYP2A6-Wildtyp an Position 209 ein Phenylalanin vorhanden ist, wird Aminosäure 481 noch vom aktiven Zentrum ausgeschlossen und darf daher auch nicht in der Aufzählung auftauchen. Die anderen erwähnten Aminosäuren kleiden das aktive Zentrum aus und sind, abhängig von Form und Größe des Substrats, an der Positionierung im aktiven Zentrum beteiligt.

In beiden oben erwähnten Artikeln hat man allerdings nur gute Substrate und Inhibitoren ins aktive Zentrum gelegt. Mittelmäßige oder schlechte Substrate von CYP2A6 (wie z. B. Testosteron), die erst in einer F209N-Mutante gut umgesetzt werden, wurden nicht in das Modell gedockt. Eine Korrelation der biologischen Daten mit den Computermodellen wurde ebenfalls nicht veröffentlicht.

Pharmakophor-Modelle Die zweite Art der Computermodelle beruht auf alleiniger Betrachtung der Substrate und ihrer Eigenschaften. Es entstehen so Pharmakophore, die auf molekularen Eigenschaften der Substrate beruhen (Volumen, Ladung, Hydrophilie/Lipophilie, u. a.). Anschließend wurden diese Pharmakophore mit biologischen Daten (K_m , IC_{50}) durch mathematische und statistische Verfahren korreliert. Ein solches Modell wurde für CYP2A5 und 2A6 von Poso und Mitarbeitern vorgelegt [105]. Sie schlossen aus ihren Untersuchungen mit 28 CYP2A-Inhibitoren, dass das aktive Zentrum von CYP2A5 größer ist als das von CYP2A6 (die Art der Inhibition wurde nicht festgestellt; in den meisten Fällen handelt es sich vermutlich um eine kompetitive Hemmung der gemessenen Cumarin-7-Hydroxylierung durch Umsetzung der zugegebenen „Inhibitoren“).

Dieselbe Arbeitsgruppe veröffentlichte eine CoMFA-Studie¹⁵ mit 16 CYP2A5-Liganden in die sterische und elektrostatische Felder, HOMO-¹⁶ und LUMO-Energien¹⁷ sowie das Dipol-Moment miteinbezogen wurden (LUMO-Energien und Dipol-Moment als 3D-Feld). Die biologischen Messwerte (als Inhibitionskonstanten; K_i) wurden dann mit diesen Feldern in einer QSAR-PLS-Untersuchung¹⁸ korreliert [106]. Die Untersuchung ergab, dass neben den sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen auch die LUMO-Felder einen deutlichen Anteil an der Bindung im Enzym haben. Das deutet auf Charge-transfer-Wechselwirkungen hin, die alle untersuchten Liganden ausbilden konnten.

In der Veröffentlichung von Lewis und Mitarbeitern wurde aus der Überlagerung der im Enzym gebundenen Substrate ein Pharmakophor gewonnen und auf gemeinsame Eigenschaften hin untersucht (Abstände von markanten Funktionen innerhalb der Substrate oder zum Häm) [103]. Sie weisen drauf hin, dass es mit einem solchen Vorgehen möglich ist vorherzusagen, welche Stoffe von CYP2A6 umgesetzt werden. Weitergehende Untersuchungen, die auf diesen Untersuchungen beruhen sind nicht veröffentlicht worden.

¹⁵CoMFA: Comparative Molecular Field Analysis

¹⁶HOMO: Highest Occupied Molecular Orbital

¹⁷LUMO: Lowest Unoccupied Molecular Orbital

¹⁸QSAR: Quantitative Structure Activity Relationship; PLS: Partial Least Square

Kapitel 4

Problemstellung und Zielsetzung

Cytochrome P450 sind eine der größten und wichtigsten Enzymfamilien überhaupt. Sie sind beteiligt an der Synthese und Verstoffwechslung vieler körpereigener und körperfremder Substanzen. Trotz ihres ähnlichen dreidimensionalen Aufbaus sind sie, durch eine große Sequenzvariation in der Lage unterschiedlichste Substrate umzusetzen. So führen schon geringe Sequenzunterschiede zur Veränderung des Substratspektrums.

Solche geringen Sequenzunterschiede führen bei Studien über die Verstoffwechslung von Arzneistoffen an Tiermodellen häufig dazu, dass die Ergebnisse nicht auf den Menschen übertragbar sind. Die unterschiedliche Enzymausstattung mit Cytochromen P450 der eingesetzten Tiere im Vergleich zum Menschen führt zu unterschiedlicher Umsetzung und Ausscheidung der Arzneistoffe. Schon die Enzymausstattung einzelner Individuen einer Spezies unterscheidet sich. So ist die genaue Kenntnis der Unterschiede im Aufbau der Cytochrome von großem Interesse. Zum einen zur Einschätzung möglicher individueller Unterschiede bei der Verstoffwechslung von Arzneistoffen und der Vermeidung von unerwünschten Wirkungen, und zum anderen bei der Beurteilung von Verträglichkeitsstudien, die an anderen Spezies wie Maus oder Kaninchen durchgeführt worden sind.

In Studien wurde deutlich, dass bei den Cytochromen P450 der Unterfamilie 2A keine Übertragbarkeit von Tiermodellen und Tierversuchen auf den Menschen zulässig ist. Die einzelnen Enzyme sind in ihren Substratspezifitäten zu unterschiedlich.

Da bisher noch keine Erkenntnisse über den dreidimensionalen Aufbau von Cytochromen dieser Unterfamilie vorliegen, sollten in dieser Arbeit Computermodelle erarbeitet werden, die in der Lage sind die Unterschiede bei der Metabolisierung eines Stoffes durch CYP2A5 und 2A6 auf molekularer Ebene zu erklären.

Auf Grund der besseren Datenlage zu CYP2A5 sollte zuerst ein Modell dieses Enzyms gebaut werden, aus dem dann, nach gründlicher Überprüfung, ein Modell von CYP2A6 abgeleitet werden sollte. Als Vorbild für die Homologie-Modellierung sollten eine oder mehrere der bislang veröffentlichten Kristallstrukturen von Cytochromen P450 dienen. Experimentelle Untersuchungen bei denen die Umsetzungsgeschwindigkeit verschiedener Substrate im CYP2A5-Wildtyp und einigen Mutanten gemessen wurden, sollten erklärt und zur Absicherung des Modells genutzt werden. Eine 3D-QSAR-Untersuchung von 28 Enzyminhibitoren, die in das aktive Zentrum von CYP2A5 eingepasst werden, sollte der Identifizierung von Aminosäuren dienen, die für die Bindung der Inhibitoren im aktiven Zentrum von großer Bedeutung sind.

Letztendliches Ziel war der Vergleich der aktiven Zentren von CYP2A5 und dem daraus abgeleiteten CYP2A6, um Unterschiede bei der Substratumsetzung zu begründen.

Kapitel 5

Methoden

Moleküldynamik-Simulationen bilden die Grundlage dieser Arbeit, da hier wirklichkeitsnahe Bedingungen für die Enzyme in ihrer natürlichen Umgebung simuliert werden. Alle Wechselwirkungen zwischen Atomen wie kovalente Bindungen, ionische (auch partiell ionische) Anziehungskräfte, van-der-Waals-Wechselwirkungen sowie spezielle, anharmonische Bindungen werden im Rahmen der Newtonschen Mechanik berücksichtigt. Ausgehend von Startpositionen für alle Atome, wie sie sich beispielsweise aus Kristallstrukturanalysen, Aminosäuresequenzen und Sekundärstrukturvorhersagen ergeben, wird die Bewegung aller Atome in konstanten Zeitintervallen berechnet und ausgewertet, bis ein stabiler Zustand erreicht ist.

Selbst bei den heute zur Verfügung stehenden Rechenleistungen sind Simulationen von ganzen Enzymen in ihrer natürlichen Umgebung aber so aufwändig, dass nur der Gleichgewichtszustand untersucht werden kann. Und auch dafür muss dieser Gleichgewichtszustand schon vor dem Start der Simulation möglichst genau bekannt sein. Dazu dienen verschiedene Hilfsmittel wie Energieminimierungen und Probefunktionen. Vor dem Start der vollständigen Simulation werden oft auch partielle Simulationen durchgeführt, bei denen Teile der Struktur über zusätzliche, künstliche Kraftkonstanten in ihrer Position fixiert werden, um die Startpositionen schrittweise zu optimieren.

Einen hervorragenden Überblick über die Methodik der Moleküldynamiksimulationen findet man in den Arbeiten von Schappach und Stoll [107, 108]. In diesem Ka-

pitel sollen Aspekte genauer beleuchtet werden, die sich mit den Besonderheiten im Cytochrom beschäftigen, speziell den Wechselwirkungen rund um das Häm-Molekül im Inneren der Cytochrome.

5.1 Kraftfelder

5.1.1 CVFF-Kraftfeld

Für die nach dem Aufbau des ersten Modells durchgeführten Energieminimierungen im HOMOLOGY-Modul von INSIGHT II [109] wurde das implementierte CVFF-Kraftfeld¹⁹ [110] benutzt. Es war ursprünglich für die Untersuchung von Peptiden und Proteinen entwickelt worden, ist inzwischen aber durch starke Erweiterung des Parametersatzes auch für andere Problemstellungen einsetzbar.

5.1.2 GROMOS96-Kraftfeld

Die meisten Energieminimierungen und alle Dynamiksimulationen wurden mit dem Programmpaket GROMACS [111–115] durchgeführt. Es wurde das dort implementierte GROMOS96-Kraftfeld zur Berechnung verwendet [116]. Gegenüber dem Standard-GROMACS-Kraftfeld, das aus dem GROMOS87-Kraftfeld hervorgegangen ist, zeigt GROMOS96 Verbesserungen hinsichtlich der Beschreibung von Proteinen und kleinen Liganden [117]. Bei Simulationen ist es in der Lage NMR-Daten von Proteinen in Lösung genauer wiederzugeben als GROMOS87 [118]. Die für das zentrale Häm-Molekül mitgelieferten Parameter des GROMOS96-Kraftfeldes konnten jedoch nicht verwendet werden. Die dort vorgesehenen Häm-Partialladungen betragen für das Eisen 0,4 und für die Pyrrolstickstoffe je -0,1. Alle anderen Atome im Tetrapyrrolysystem blieben ungeladen. Eine solche Ladungsverteilung ist unkorrekt und liefert in Dynamiksimulationen verzerrte Häm-Geometrien. Aus der Arbeit von Schappach wurden daher die von Wade veröffentlichten und zur Verfügung gestellten Partialladungen für die Behandlung der Häm-Atome übernommen (s. Abb. 5.1) [107, 119]. Neben den Partialladungen konnten noch weitere Parameter übernommen werden, die die Beschrei-

¹⁹CVFF = Consistent Valence Force Field

bungskraft für das Häm noch zusätzlich verbesserten. Alle geänderten Parameter sind in den Tabellen 5.1 und 5.2 aufgeführt.

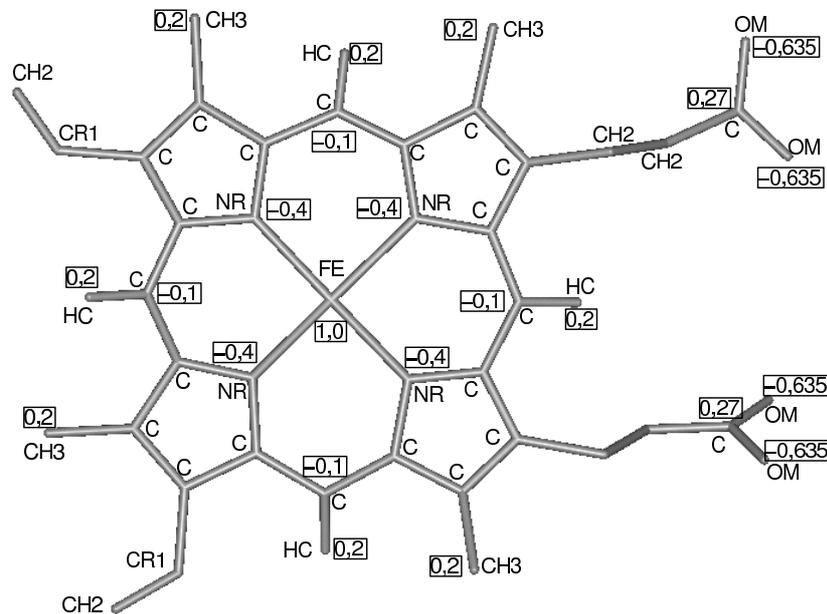


Abbildung 5.1: Darstellung des Häm-Moleküls mit allen bei der Berechnung in GROMACS berücksichtigten Wasserstoff-Atomen mit Bezeichnung der Atomtypen. Die von null verschiedenen Partialladungen sind in Kästen angegeben.

Tabelle 5.1: Neu definierte Parameter im GROMOS96-Kraftfeld.

Bindung	Bindungslänge (nm)	Kraftkonstante ($\text{kJ} \cdot \text{nm}^{-2} \cdot \text{mol}^{-1}$)
FE-S	0,234	$2,680 \cdot 10^6$
Bindungswinkel	Winkel ($^\circ$)	Kraftkonstante ($\text{kJ} \cdot \text{rad}^{-2} \cdot \text{mol}^{-1}$)
CH2-S-FE	100	475
S-FE-NR	90	420
Torsionswinkel	Winkel ($^\circ$)	Kraftkonstante ($\text{kJ} \cdot \text{rad}^{-2} \cdot \text{mol}^{-1}$)
CA-CH2-S-FE	0	2,93
CH2-S-FE-NR	0	0
Lennard-Jones	Parameter A ($\text{kJ} \cdot \text{nm}^{-12} \cdot \text{mol}^{-1}$)	Parameter B ($\text{kJ} \cdot \text{nm}^{-6} \cdot \text{mol}^{-1}$)
FE	$4,301 \cdot 10^{-5}$	$8,869 \cdot 10^{-3}$

Tabelle 5.2: Partialladungen am Häm (s. auch Abb. 5.1).

Atomtyp	Partialladung (e)
FE	1,0
NR	-0,4
C (zw. Pyrrolringen)	-0,1
HC	0,2
CH3	0,2
C (Propionate)	0,27
OM	-0,635
S	0,6
CH2 (Cystein)	0,1

5.1.3 Ewald-Methode (PME)

Zur Berechnung der elektrostatischen Interaktionen wurde die PME-Methode (Particle Mesh Ewald) benutzt. Sie hat sich der klassischen Cut-Off-Methode gegenüber als überlegen bezüglich Genauigkeit und Rechenaufwand herausgestellt [120, 121]. Die PME-Methode folgt der von Ewald 1921 erarbeiteten Methode zur exakten Berechnung von elektrostatischen Kräften in Kristallen. Dabei wird die nach Gleichung 5.1 nur sehr langsam konvergierende, elektrostatische Gesamtenergie von N Partikeln mit ihren periodischen Spiegelbildern durch zwei schnell konvergierende Summen und einen konstanten Term ersetzt (Gleichung 5.2).

$$V = \frac{f}{2} \sum_{n_x} \sum_{n_y} \sum_{n_z^*} \sum_i^N \sum_j^N \frac{q_i q_j}{\mathbf{r}_{ij,\mathbf{n}}} \quad (5.1)$$

$$V = V_{dir} + V_{rezi} + V_0 \quad (5.2)$$

$(n_x, n_y, n_z) = \mathbf{n}$ steht für den Ursprungsvektor der Einheitszelle. Der Stern zeigt an, dass der Term $i = j$ vernachlässigt wird, wenn $(n_x, n_y, n_z) = (0, 0, 0)$ ist. Der Abstand $\mathbf{r}_{ij,\mathbf{n}}$ steht für den wahren Abstand zweier Ladungen q_i und q_j voneinander. Die entstandenen Summen (V_{direkt} und $V_{reziprok}$) sowie die Konstante V_0 werden dabei über die

folgenden Gleichungen berechnet:

$$V_{dir} = \frac{f}{2} \sum_{i,j}^N \sum_{n_x} \sum_{n_y} \sum_{n_z^*} q_i q_j \frac{\operatorname{erfc}(\beta |\mathbf{r}_{ij,\mathbf{n}}|)}{|\mathbf{r}_{ij,\mathbf{n}}|} \quad (5.3)$$

$$V_{rezi} = \frac{f}{2\pi V} \sum_{i,j}^N q_i q_j \sum_{m_x} \sum_{m_y} \sum_{m_z^*} \frac{\exp\left(-(\pi\mathbf{m}/\beta)^2 + 2\pi i\mathbf{m} \cdot (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)\right)}{\mathbf{m}^2} \quad (5.4)$$

$$V_0 = -\frac{f\beta}{\sqrt{\pi}} \sum_i^N q_i^2 \quad (5.5)$$

β gibt dabei die relative Wichtung von direkter und reziproker Summe und $\mathbf{m} = (m_x, m_y, m_z)$ vor. Aus dieser Art der Berechnung folgen sehr genaue Werte für die elektrostatischen Interaktionen der Atome, selbst dann, wenn man nur einen relativ kleinen Radius für die Berechnung der direkten Summe von etwa 1 nm wählt.

Unglücklicherweise steigt der Rechenbedarf für die Berechnung der reziproken Summe mit N^2 (N = Anzahl der Atome im System) an. Daher ist ihre Bestimmung für große Systeme unrealistisch. Hier setzt die von Darden vorgeschlagene PME-Methode an [122,123]. Die Ladungen werden mittels einer Wichtungsfunktion auf ein Gitternetz interpoliert. Dieses Gitter wird dann über einen 3D-FFT-Algorithmus (FFT = Fast Fourier Transformation) transformiert und das Potential über die Gitterpunkte durch inverse Transformation errechnet. Über die Gewichtungsfaktoren werden dann die elektrostatischen Kräfte für jedes Atom bestimmt. Dieser Algorithmus skaliert mit $N \log(N)$ und ist damit deutlich schneller als die originale Ewald-Methode für die Bestimmung der reziproken Summe bei der Berechnung großer Systeme.

5.2 Distance Restraints

Die Dynamiken der Proteine in der Wasserbox liefen nach einer Äquilibrierungsphase ohne Rückhaltekräfte ab. Ein Problem stellte die Einführung eines Sauerstoffmoleküls in das System dar, denn die koordinative Wechselwirkung zwischen Sauerstoff und Häm-Eisen wird in Kraftfeld-Rechnungen nicht berücksichtigt. Um den Sauerstoff dennoch auf seiner Position oberhalb des Eisens zu halten, wurden die Abstände des einen Sauerstoffatoms (O1) zum Häm-Eisen (FE) sowie zu den vier

Pyrrol-Stickstoffen (NR) mit "distance restraints" auf eine bestimmte Länge festgelegt (s. Abb 5.2).

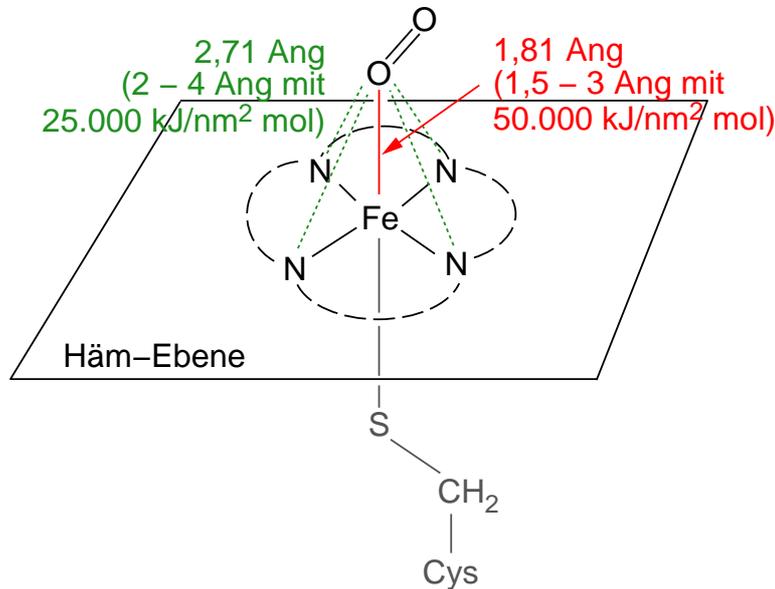


Abbildung 5.2: Fixierung des Sauerstoff-Moleküls oberhalb des Häm-Eisens mit Angabe der gemessenen Abstände in der Kristallstruktur von CYP101. In Klammern sind die in der Simulation gewählten Abstandsbereiche und die Kräfte angegeben, mit denen das O1-Sauerstoff-Atom an das Eisen gebunden wurde.

Die Einhaltung dieses Abstandskriteriums erfolgte durch die Berechnung einer Straffunktion, die eine Rückholkraft auf das Atom legt, sobald es die vorgegebenen Schwellenwerte über- oder unterschreitet. Gleichung 5.6 gibt die Berechnung der Straffunktion an, die einem quadratischen Term bei Unter- oder Überschreitung von r_0 bzw. r_1 entspricht und sich in linearer Form oberhalb von r_2 fortsetzt. Dabei steht r_{ij} für den Abstand der Atome, r_0 für den unteren und r_1 sowie r_2 für die beiden oberen Schwellenwerte. k_{dr} ist eine Kraftkonstante, die bei der Definition der Restraints festgelegt wird und über die Steilheit der Straffunktion die Festigkeit der Abstände steuert.

$$V_{dr}(r_{ij}) = \begin{cases} \frac{1}{2}k_{dr} (r_{ij} - r_0)^2 & \text{für } r_{ij} < r_0 \\ 0 & \text{für } r_0 \leq r_{ij} < r_1 \\ \frac{1}{2}k_{dr} (r_{ij} - r_1)^2 & \text{für } r_1 \leq r_{ij} < r_2 \\ \frac{1}{2}k_{dr} (r_2 - r_1) (2r_{ij} - r_2 - r_1) & \text{für } r_2 \leq r_{ij} \end{cases} \quad (5.6)$$

Die gewählten Kraftkonstanten sind mit 25000 bzw. 50000 $\frac{\text{kJ}}{\text{nm}^2 \cdot \text{mol}}$ im Vergleich zu Kraftkonstanten, die auf echten Bindungen liegen ($5 \cdot 10^5$ bis $2 \cdot 10^7 \frac{\text{kJ}}{\text{nm}^2 \cdot \text{mol}}$) sehr klein. Das Sauerstoff-Molekül wird also nur mit einer geringen Kraft belegt, die gerade stark genug ist, das Abdriften des Moleküls von seiner Startposition zu verhindern. Während der Dynamik macht sich diese geringe Kraft durch eine kleine Vergrößerung des zu Beginn eingestellten O1-FE-Abstands von 1,81 Å auf 1,9 - 2,0 Å bemerkbar. Diese geringe Vergrößerung kann aber während der Dynamik durchaus toleriert werden.

5.3 Homologie-Modelling

Beim Homologie-Modelling wird die unbekannte 3D-Struktur eines Proteins mit Hilfe von verwandten Proteinen aufgebaut. Hierzu wird zuerst eine Auswahl von verwandten Proteinen getroffen, die als Modellierungsvorbild (Templat) dienen können. Nach Untersuchung der Ähnlichkeit der Template untereinander und mit der Modellsequenz wird ausgewählt, ob die Verwandtschaft der Modellsequenz zu einem Templat so groß ist, dass es als alleiniges Vorbild dienen soll (Replacement-Methode) oder ob ein Modell aus mehreren Templaten aufgebaut wird, wobei das Modell aus den jeweils ähnlichsten Teilen der Template aufgebaut wird (Consensus-Methode). Teile der Modellsequenz, die nicht von den Templaten wiedergegeben werden, müssen aus nicht verwandten Proteinen eingefügt (Loop-Search) oder ganz neu berechnet werden (de-novo-Generierung). Ein genauer Einblick in die dabei verwendeten Methoden wird in der Arbeit von Schappach gegeben [107]

5.4 AutoDock

Das verwendete Programm AutoDock 2.4 bietet die Möglichkeit, die Wechselwirkungen von kleinen Molekülen mit einem Makromolekül vorherzusagen und es flexibel in einer Proteinstruktur zu positionieren (Docking). Das Docking erfolgt dabei schrittweise.

In der Prozedur AutoGrid wird das Protein in ein dreidimensionales Gitter bestimmter Größe eingebettet und ein Sondenatom auf jedem Gitterpunkt platziert. Die Wechselwirkungsenergie jedes Sondenatoms mit dem Protein wird dabei den Gitterpunkten zugewiesen. Typischerweise wird ein solches Affinitätsgitter für jeden in den Liganden vorkommenden Atomtyp berechnet. Außerdem wird noch ein Gitter für die elektrostatischen Wechselwirkungen mit einer Punktladung von +1 berechnet. Die Berechnung der Gesamtwechselwirkungsenergie eines Substrats erfolgt über die getrennte Berechnung der Interaktion jedes Atoms mit den acht umgebenden Grid-Punkten. Dabei werden die elektrostatischen Wechselwirkungen unabhängig von den Atomtyp-Gittern berechnet.

Für das eigentliche Docking wird eine Monte Carlo Simulated Annealing-Methode verwendet. Dabei ist das Protein starr, und der Ligand bewegt sich durch den freien Raum im Protein. Während der Berechnung werden die Freiheitsgrade im Liganden (Rotation um jede frei drehbare Bindung, Verschiebung des Massezentrums, Veränderung der Orientierung) bei jedem Simulationsschritt einer kleinen zufälligen Änderung unterzogen. Für jede neue Konfiguration des Liganden wird die Interaktionsenergie berechnet und mit der des vorherigen Schritts verglichen. Eine neue Konfiguration mit niedrigerer Energie wird sofort akzeptiert. Ob eine Konfiguration mit höherem Energiegehalt akzeptiert oder verworfen wird, hängt von einer nutzerdefinierten Temperatur ab, die über die Wahrscheinlichkeit der Annahme einer Struktur entscheidet. Je höher die Temperatur ist, um so wahrscheinlicher wird die Konfiguration angenommen. Die gesamte Docking-Prozedur besteht aus einer Serie von Läufen, an deren Ende jeweils eine Struktur als Docking-Ergebnis ausgegeben wird. Jeder Lauf besteht aus mehreren Zyklen bei fester Temperatur. Jeder Zyklus beinhaltet eine große Zahl einzelner Schritte, in denen die Konformation der Liganden verändert wird. Die Temperatur, die über die Annahme von Konformationen mit höherer Energie als die vorausgehende

entscheidet, ist innerhalb eines Zyklus konstant und wird nach einer bestimmten Anzahl von angenommenen oder abgelehnten Schritten, mit Beginn eines neuen Zyklus, erniedrigt. Jeder Lauf beginnt wieder bei der Anfangstemperatur.

Die erhaltenen Konformationen werden auf Ähnlichkeit untersucht und Konformationen, die unterhalb eines Grenzwertes liegen werden in Familien zusammengefasst. Die Ähnlichkeit wird über den RMS-Wert der Strukturen berechnet (Standardwert: $rmstol = 0,5 \text{ \AA}$)

5.5 GRID / GOLPE

Die Programme GRID [124–127] und GOLPE [128, 129] können als Kombination zur Erstellung von 3D QSAR-Untersuchungen genutzt werden.

GRID Mit Hilfe des Programms GRID werden Wechselwirkungsenergien zwischen Molekülen und sogenannten Sonden berechnet, die funktionelle Gruppen simulieren. Die zu untersuchenden Liganden werden in ein dreidimensionales Gitter gelegt, an dessen Punkten jeweils die Wechselwirkungsenergie mit der gewählten Sonde berechnet wird. Die errechneten Wechselwirkungsenergien dienen dann dem Programm GOLPE als Eingangsdaten. Aus der Liste von etwa 60 Sonden wurden in dieser Arbeit die N2-Sonde, die einen Amid-Stickstoff simuliert, und die dry-Sonde verwendet. Die dry-Sonde wird auch als "trockenes Wasser" bezeichnet und ist dazu geeignet hydrophobe Wechselwirkungen aufzuzeigen. Die Parameter der verwendeten Sonden sind in Tabelle 5.3 aufgeführt.

GOLPE Das Programm GOLPE ist ein Statistik-Programm, mit dem die eigentliche 3D-QSAR-Analyse durchgeführt wird. Es werden dabei aus den Tausenden von Datenpunkten der GRID-Berechnung über statistische Methoden die Punkte herausgefiltert, die eine Bedeutung für die Erklärung der Unterschiede in der biologischen Aktivität der untersuchten Liganden (Trainingssatz) besitzen. Das Programm führt dabei neben der Reduktion auf die wichtigsten Punkte auch eine Wichtung der verbleibenden durch. Dabei werden verschiedene Linearkombinationen der Punktwerte mit den

Tabelle 5.3: Parameter der verwendeten GRID-Sonden (N2: amidischer Stickstoff, dry: hydrophobe Sonde ("trockenes Wasser"))

spezifische Eigenschaften der molekularen Sonden	N2	dry
van-der-Waals-Radius (Å)	1,70	1,70
effektive Anzahl der Elektronen	8	7
Polarisierbarkeit (Å ³)	1,7	1,20
Partiellladung	0	0
optimale H-Brücken- Bindungsenergie (kcal/mol)	-5,25	-4,5
optimaler Radius der H-Brücke (Å)	1,50	1,40
Anzahl der donierten H-Brücken	2	2
Anzahl der akzeptierten H-Brücken	0	2

biologischen Daten korreliert, und so lange verändert, bis eine optimale Linearkombination gefunden ist. Diese Kombination der Punktwerte kann nachfolgend dann auch für Vorhersagen der biologischen Aktivität von neuen Substanzen genutzt werden, die bei der Erstellung des Modells nicht berücksichtigt worden sind (Testsatz). Es gibt bei der Erstellung der Modells und der Austestung der verschiedenen Linearkombinationen unterschiedliche Kriterien das jeweilige Modell zu prüfen und weiter zu verbessern. Eines der härtesten Kriterien für die Testung ist die *Random Groups*-Methode. Dabei werden die Liganden zufällig in meistens fünf Gruppen eingeteilt, von denen eine Gruppe bei der Erstellung des Modells nicht berücksichtigt wird. Diese Gruppe (20 % der Liganden) wird anschließend als interner Testsatz zur Vorhersage genutzt. Es werden viele Modelle erstellt, die durch die verschiedene Gewichtung der einzelnen Variablen immer weiter verfeinert werden. Jeder Ligand wird bei dieser Art der Testung mindestens einmal aus der Modellerstellung ausgenommen. Korreliert man nun die mit dem Modell vorhergesagten Werte mit den gemessenen biologischen Aktivitäten resultiert daraus der kreuzvalidierte q^2 -Wert, der nach Gleichung aus den Abweichungsquadraten der Vorhersage berechnet wird. Er gibt zusammen mit dem SDEP²⁰-Wert ein Maß für die Güte und Vorhersagekraft des Modells (s. Gleichung 5.8).

²⁰SDEP = Standard Deviation of Error Prediction

$$q^2 = 1 - \frac{\sum(y_{pred} - y_{obs})^2}{\sum(y_{obs} - \bar{y})^2} \quad (5.7)$$

q^2	kreuzvalidierter Korrelationskoeffizient
y_{pred}	vorhergesagter Wert
y_{obs}	gemessener Wert
\bar{y}	Durchschnitt

$$SDEP = \sqrt{\frac{\sum_i(y_{pred} - y_{obs})^2}{N}} \quad (5.8)$$

$SDEP$	Standardabweichung der Fehlervorhersage
y_{pred}	vorhergesagter Wert
y_{obs}	gemessener Wert
N	Zahl der Liganden

Durch den großen internen Testsatz kann bei der Erstellung auch auf einen externen Testsatz weitgehend verzichtet werden. Ein q^2 -Wert von +1 entspricht einem idealen Modell, bei dem alle Vorhersagen exakt mit den gemessenen Werten übereinstimmen. Bei einem q^2 -Wert von 0 sind die erhaltenen Vorhersagen so gut wie kein Modell. Ein negativer q^2 -Wert zeigt an, dass die Vorhersagen schlechter sind, als wenn man jeder Substanz den Mittelwert aller Affinitäten zugeteilt hätte. Verlässliche Modelle besitzen in der Regel einen q^2 -Wert von mindestens 0,6. Für die genauere Beschreibung der statistischen Methoden sei auf die Arbeit von Stoll verwiesen [108].

Kapitel 6

Durchführung und Ergebnisse

Bei den Cytochromen P450 2A5 und 2A6 handelt es sich um membrangebundene Enzyme, die bisher noch nicht kristallisiert wurden. Die Schwierigkeit besteht darin, das Enzym aus der Membran herauszulösen, ohne die Gesamtstruktur des Enzyms allzu stark zu stören. Zwar wurde schon eine stabile, wasserlösliche Mutante eines Cytochroms der 2A-Unterfamilie hergestellt (CYP2A4), aber eine Kristallisation des Enzyms, um die Struktur mit Hilfe der Röntgenkristallographie aufzuklären, wurde noch nicht versucht [130]. Die erste Kristallstruktur eines ursprünglich membrangebundenen Cytochroms P450 wurde erst im Jahr 2000 veröffentlicht [17].

Solange keine direkten Daten über die Struktur eines Proteins vorliegen, muss man Modelle der gesuchten Strukturen erstellen. Hierzu wird meist die Methode der Homologie-Modellierung benutzt. Grundlage sind dabei immer eine oder mehrere Kristallstrukturen, deren 3D-Koordinaten zum Aufbau des Modells verwendet werden. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich auf die Strukturen von CYP101 (P450_{cam}), CYP102 (P450_{BM-3}), CYP108 (P450_{terp}), CYP107A1 (P450_{EryF}) und CYP2C5 zurückgegriffen.

6.1 Ähnlichkeit der Kristallstrukturen

6.1.1 Sequenzvergleich der Cytochrom P450-Kristallstrukturen

Um ein geeignetes Vorbild für die zu erstellenden Modelle zu finden, wurden zunächst die vorhandenen Cytochrom P450-Kristallstrukturen auf ihre Ähnlichkeit hin untersucht (vgl. Tab. 2.1 auf Seite 18). Die Struktur von P450_{NOR} wurde, obwohl sie zu Beginn der vorgelegten Arbeit schon aufgeklärt war, nicht mitbetrachtet, weil sie keine Hydroxylase-Aktivität aufweist. Die Strukturen von CYP51 und CYP119 erschienen erst nach Beginn der Arbeit und konnten daher nicht mitbetrachtet werden. Ebenfalls nach Beginn veröffentlicht wurde die Struktur von CYP2C5, das aber auf Grund seiner nahen Verwandtschaft zu den CYP2A-Enzymen in die Untersuchungen noch mit aufgenommen wurde.

Um herauszufinden, welche Methode für einen Sequenzvergleich bei Cytochromen P450 am besten geeignet ist, wurden verschiedene Methoden mit den Sequenzen der Kristallstrukturen getestet. Zur Anwendung kamen die Programme CLUSTAL W [131] und 123D [132], sowie die im Programmpaket INSIGHT II [109] implementierten Routinen zum paarweisen Alignment²¹ und zur Erstellung von Multi-Alignments. Die Bewertung der erstellten Alignments erfolgte mit Hilfe der aus den Kristallstrukturen bekannten Positionen von Helices und Faltblättern. Bei der Erstellung der Alignments wurden die Matrizen und Bewertungsparameter der Programme variiert, um die Alignments zu verbessern. Die Ergebnisse konnten jedoch nur teilweise befriedigen.

Alle Programme waren in der Lage, im stark konservierten C-terminalen Bereich der Sequenzen, in der die Häm-Umgebung, die Cystein-Tasche und die Helices I und L liegen, das Alignment korrekt vorzunehmen. Im variableren N-terminalen Bereich konnte jedoch keines der Programme gute Übereinstimmungen der Kristallstrukturen erzielen. Auch in den postulierten Substraterkennungs-Regionen (SRS²²) zeigten sich große Verschiebungen. Auf Grund der geringen Sequenzidentitäten der Kristallstruk-

²¹Alignment: Anordnung von zwei oder mehr Proteinsequenzen untereinander, wobei Aminosäuren in einer Spalte eine ähnliche räumliche Position einnehmen.

²²SRS = Substrate Recognition Sites

turen untereinander (14-25 %) sind Programme, die Alignments nur basierend auf der Aminosäuresequenz erstellen, bei Cytochromen P450 nicht erfolgreich.

6.1.2 Automatischer Strukturvergleich

Wie schon in Kapitel 2.4 erwähnt, weisen die bisher aufgeklärten Kristallstrukturen von Cytochromen P450 alle eine ähnliche räumliche Faltung auf. Mit Hilfe dieser räumlichen Anordnung kann ein strukturbasiertes Alignment der Aminosäuresequenzen erarbeitet werden. Hierzu werden die Abstände der C α -Atome eines Proteins untereinander in eine Matrix eingetragen und kleine Ausschnitte (Blöcke) mit der Matrix eines anderen Proteins verglichen. Für jeden Block wird der RMSD-Wert²³ mit allen Blöcken des anderen Proteins berechnet und die Position der kleinsten Abweichung gespeichert. Nach Vergleich aller Blöcke entsteht eine mehrdimensionale Matrix, in der nach Pfaden kleiner Abweichung gesucht wird. Diese Bereiche werden anschließend zur Erstellung eines Alignments und zur Superpositionierung der Strukturen herangezogen. Bei diesem Vorgehen werden bessere Ergebnisse erzielt als beim rein sequenzbasiertem Alignment. Man findet hier sehr gute Übereinstimmungen im C-terminalen Bereich der Proteine und auch im N-terminalen Bereich werden die aus den Kristallen bekannten Sekundärstrukturen besser identifiziert.

Doch auch diese Art des Alignments ist in einigen kritischen Bereichen (Helices B', G, F) noch nicht ganz zufriedenstellend. So wurde von Hasemann und Mitarbeitern und von Loew und Mitarbeitern ein Alignment erstellt, das sich sehr streng an den Kristallstrukturen und ihrer dreidimensionalen Überlagerung orientiert [20, 133]. Da die Kristallstruktur von CYP101 (P450_{cam}) die erste verfügbare Struktur eines Cytochroms war und sich bei allen später aufgeklärten Strukturen die Helices und β -Faltblattstrukturen in ähnlicher räumlicher Lage wiederfinden lassen, wurde die Nomenklatur der Sekundärstrukturelemente bei P450-Proteinen an der Abfolge in CYP101 orientiert. Abbildung 6.1 zeigt diese Nomenklatur am Beispiel von CYP2C5.

Aus diesem strukturbasierten Alignment sowie aus vielen weiteren Untersuchungen (z. B. Mutationsstudien, Sequenzvergleichen und chemischer Modifikation von Oberflächen-Aminosäuren) konnte man Erkenntnisse über die einzelnen Sekundär-

²³RMSD: Root Mean Square Deviation

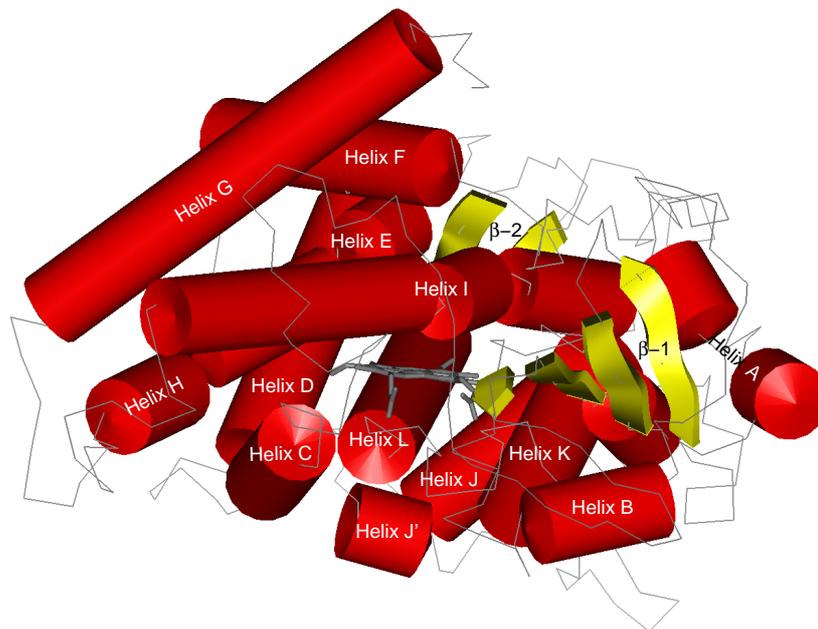


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Nomenklatur für CYPs am Beispiel von CYP2C5. Der Loop zwischen Helix F und G konnte in der Röntgenkristallstrukturanalyse nicht aufgeklärt werden.

strukturen und ihren Aufbau gewinnen. Es wurden charakteristische Motive identifiziert, die die Einbeziehung neuer Sequenzen in das Alignment erleichtern. Allgemein sind Cytochrome P450 aufgebaut aus einem Protein-Teil (Apoenzym) und einem eisen-tragenden Nicht-Protein-Teil (Häm = Coenzym). Das Häm wird im Enzym von einem Cystein am Eisen-Atom gebunden. Das Häm ist Teil des aktiven Zentrums. Auf der, dem Cystein abgewandten Seite, werden Substrate gebunden und umgesetzt. Die Proteinumgebung auf dieser Seite ist bei den Cytochromen sehr variabel und ist Voraussetzung für ihre große Substratvielfalt. Diese große Variabilität ist besonders in den SRS lokalisiert, die bei den CYPs das aktive Zentrum aufbauen. Im Folgenden wird ein Überblick über die aus der Literatur bekannten Charakteristika gegeben:

Das N-terminale Ende bildet bei den mikrosomalen Cytochromen die Region, mit der die Enzyme in der Membran verankert sind. Sie hat vermutlich helicale Struktur und ist hydrophob. Diese Region wird beim Modellieren von CYPs meist vernachlässigt, weil ihre korrekte Modellierung in einer Membran die Simulationen stark verkomplizieren würde. Ausserdem liegt sie in großer Entfer-

nung zum aktiven Zentrum und ist für die Funktion von Cytochromen P450 nicht von essentieller Bedeutung, da Mutanten, denen dieser Membrananker fehlt, trotzdem funktionstüchtig sind [130]. Aus diesem Grund wurden auch die Sequenzen der bearbeiteten Modelle um 40 Aminosäuren verkürzt, wobei die Bezifferung programmintern geändert werden musste. In dieser Arbeit wird sie aber größtenteils in ursprünglicher Form beibehalten.

Polyprolin Region Bei den membrangebundenen Cytochromen findet man im Anschluss an den Membrananker ein Motiv aus mehreren Prolinen. Für diese Proline wird eine konformatorische Funktion angenommen, die die Position des Enzyms an der Membran beeinflusst.

Helix A Kurz vor dem Beginn von Helix A erscheint bei allen Mitgliedern der CYP2A-Familie ein Asparagin. Dieses Asparagin leitet bei einigen der Kristallstrukturen eine kurze 3_{10} -Helix ein. (Bei CYP2C5 ist diese A'-Helix nicht zu finden.) Helix A selbst ist innerhalb der CYP2A-Familie gut konserviert und gemeinsam mit der sich anschließenden Faltblattregion β_1 am Eingang des Zugangskanals zum aktiven Zentrum lokalisiert.

β -Faltblatt 1 Dieses Faltblatt besteht aus vier bis fünf Strängen. Die ersten beiden Stränge folgen in der Sequenz den Aminosäuren der A-Helix. Sie sind durch mehrere hydrophobe Aminosäuren gut erkennbar. Die weiteren Stränge des Faltblattes sind am Ende der Sequenz zu finden.

Helix B Diese Helix enthält ein typisches Motiv aus vier Aminosäuren, das innerhalb der CYP2-Familie meist als KEAL oder REAL konserviert ist (in den Kristallstrukturen findet man auch KEAC, REAY und KAAL). Die auftretende basische Aminosäure (Lys98 in CYP2A5) wird als Bindungspartner für die Reduktase und/oder Cytochrom b_5 diskutiert. Ein Einfluss dieser Position auf die Redoxpartner-Bindung konnte für CYP101 gezeigt werden [134, 135]

B-C-Übergang Der Übergang von Helix B zu Helix C ist nicht konserviert. Er bildet die erste Substraterkennungsregion (SRS 1). In dieser Region findet man eine relativ geringe Homologie und es kommt zu Variationen der Sequenzlänge und der räumlichen Anordnung. Hier liegt V117 aus CYP2A5, eine der substratbestimmenden Aminosäuren dieses Enzyms (s. Kap. 3.2.3).

Die bei den Prokaryonten in unterschiedlicher Lage vorkommende B'-Helix ist bei den Eukaryonten möglicherweise gar nicht vorhanden. Grundlage für diese Hypothese ist die Kristallstruktur von CYP2C5, dem bisher einzigen aufgeklärtem Cytochrom eines Säugetiers (s. Abb. 6.2).

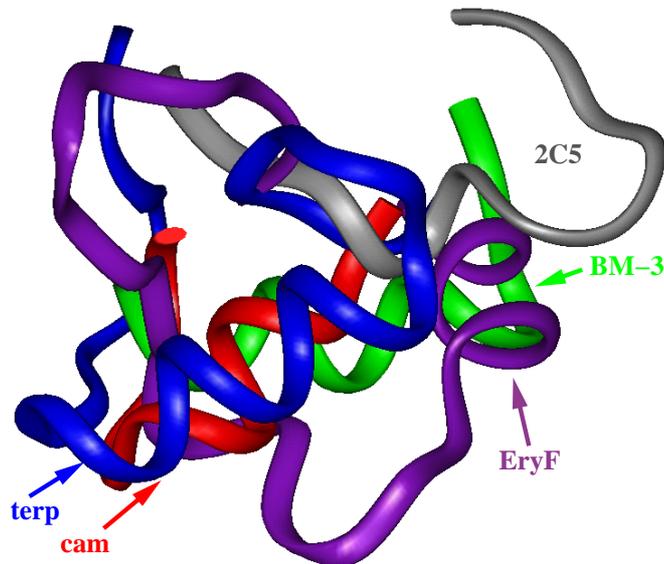


Abbildung 6.2: Ribbon-Darstellung der B'-Region der Kristallstrukturen. Die Kristallstrukturen sind mit dem Häm überlagert. Der B'-Helix von EryF geht ein langer Loop voraus und die Helix liegt etwa senkrecht zu den B'-Helices von cam, terp und BM-3. CYP2C5 weist in diesem Sequenzabschnitt gar keine Helix auf. Das Alignment ist in Abb. 6.3 dargestellt.

Helix C Die C-Helix stellt wieder einen hochkonservierten Bereich dar, der durch das konservierte Motiv WKxxRRxS²⁴ bei Eukaryoten gut zu identifizieren ist. Das zweite in diesem Motiv erscheinende Arginin zeigt bei den Kristallstrukturen in Richtung Häm und formt eine Ionenpaarbindung mit einer Propionat-Seitenkette. Eine Mutation dieser Position bei CYP2A6 (R128L) führt zu einem weniger aktiven Enzym, auf Grund einer ungenügenden Häm-Inkorporation. Die anderen basischen Aminosäuren (besonders das Tryptophan) zeigen nach außen und sind Wechselwirkungspartner für die Reduktase.

Helix D beginnt in der CYP2-Familie mit einem Glycin, dem ein konserviertes Lysin (K142 bei CYP2A5) vorangeht. Dieses Lysin ist auch ein Wechselwirkungspart-

²⁴x: Platzhalter für eine beliebige Aminosäure, obwohl meist gewisse Präferenzen bestehen.

ner für die Reduktase. Helix D bildet zusammen mit den Helices E, I und L ein Helixbündel, das den Kern der Cytochrom P450-Strukturen ausmacht.

Helix E Auffällig in Helix E ist ein invariantes Isoleucin, das mit einer hydrophoben Seitenkette der I-Helix interagiert. Neben dem konservierten Isoleucin beinhaltet diese Helix noch andere hydrophobe Aminosäuren. Gemeinsam mit den Helices G, I und L bildet Helix E ein weiteres Helixbündel, das einen "griechischen Schlüssel" formt, ein bei Globinen häufig vorkommendes Motiv.

Helix F bildet die zweite Substraterkennungsregion. In dieser SRS 2 liegt F209 aus CYP2A5, das für die Größe des aktiven Zentrums und die Funktion des Enzyms eine entscheidende Rolle spielt. Alignments sind wegen der geringen Homologie in diesem Bereich schwierig. Helix F weist in den Kristallstrukturen unterschiedliche Längen auf. Das Ende der Helix und damit der Beginn des Loops kann nicht immer festgelegt werden, weil der Übergang zur G-Helix eine große konformatorische Flexibilität aufweist. So war die Position des Loops bei den Strukturen von P450_{terp} und CYP2C5 aus der Röntgenstruktur nicht bestimmbar. Ein Hinweis auf die Lage des F-G-Loops bei Eukaryonten stammt aus Experimenten mit CYP2B1, bei denen der Loop von Antikörpern erkannt wurde, was darauf hinweist, dass er von außen zugänglich ist. In großen Multi-Alignments wurde deutlich, dass der F-G-Loop bei Eukaryonten grundsätzlich länger ist als bei Prokaryonten. Man diskutiert für den F-G-Loop verschiedene Funktionen. Einerseits könnte der Loop, zusätzlich zum Membrananker, das mikrosomale Cytochrom in der Membran befestigen. Darauf deutet die geringe Homologie der Sequenzen von Prokaryonten und Eukaryonten in diesem Bereich hin (vgl. Abb. 2.3 auf Seite 20). Andererseits liegt der Loop oberhalb eines möglichen Zugangskanals zum aktiven Zentrum und könnte dort als "Deckel" den Einlass ins aktive Zentrum regulieren.

Helix G Die G-Helix enthält die dritte SRS. Mutationsstudien an CYP2B1 mit Aminosäuren aus diesem Bereich haben aber keine Änderungen der Substratspezifitäten ergeben, so dass SRS 3 in Cytochromen der CYP2-Familie keinen Kontakt zum aktiven Zentrum zu haben scheint (vgl. Abb. 6.1). In der Helix G finden sich einige geladene Aminosäuren, von denen manche mit der Reduktase wech-

selwirken und andere mit geladenen Aminosäuren der H-Helix interagieren und so die räumliche Struktur der Cytochrome stabilisieren.

Helix H Diese Helix ist relativ kurz und gut konserviert. Sie lässt sich in allen Kristallstrukturen problemlos finden und enthält neben hydrophoben auch die oben erwähnten geladenen Aminosäuren.

Helix I ist die längste und auffälligste Helix der Cytochrome P450. Sie durchzieht das gesamte Enzym und verläuft direkt oberhalb des Häm. Zusammen mit der L-Helix, die unter dem Häm verläuft, nimmt die I-Helix das Häm in eine "Sandwich-Struktur" und schirmt das aktive Zentrum von der Umgebung ab.

In den Kristallstrukturen erkennt man etwa in der Mitte der Helix einen leichten Knick. Das normale Wasserstoffbrücken-Muster ist hier unterbrochen und die Helix etwas erweitert. Sie ist so in der Lage, in der entstandenen Tasche ein Wassermolekül aufzunehmen. Dieses Wassermolekül liefert bei einer ablaufenden Hydroxylierungsreaktion Protonen an das am Häm-Eisen gebundene Sauerstoff-Molekül, das zu Wasser und einer reaktiven Sauerstoff-Spezies gespalten wird (vgl. Kap. 2.5 auf Seite 20). Das für die Aufweitung der Helix verantwortliche Gx(D/E)T-Motiv ist darum auch nahezu invariant. Nur bei EryF ist das Threonin durch ein Alanin ersetzt, wobei die wasserstoffbrückenakzeptierende und -donierende Funktion des Threonin hier von einer Hydroxyl-Funktion des spezifischen Substrates Erythronolid B imitiert wird.

Bedingt durch die Nähe zum Häm bildet ein Bereich ober- und unterhalb des zentralen Motivs die Region SRS 4. Die Funktion dieser Aminosäuren wurde bisher noch nicht geklärt, weil in diesem Bereich bisher nur Mutationsstudien im Gx(D/E)T-Motiv durchgeführt wurden, die meist zu totalem Wirkungsverlust führten. Für die CYP2-Familie sind daher keine Aminosäuren in diesem Bereich bekannt, die die Substratspezifität beeinflussen.

Helix J Direkt an die I-Helix schließt sich Helix J an. Sie beginnt mit einem Prolin, gefolgt von einem charakteristischen Muster aus geladenen und hydrophoben Aminosäuren. Die Verbindung der J- zur K-Helix ist nicht gut konserviert. Die gelegentlich auftretende J'-Helix scheint nur bei Cytochromen der Klasse II aufzutreten (vgl. Kap. 2.3).

Helix K ist gut konserviert und trägt die ersten vier Aminosäuren eines ExxR/(R/H)-Motivs. Die zweite basische Aminosäure (R oder H) befindet sich in der Mäander-Region. Die Aminosäuren dieses Motivs bilden untereinander ionische Wechselwirkungen aus, wobei bei den eukaryotischen Enzymen der CYP2-Familie die zweite basische Aminosäure als Histidin konserviert ist, das sich in der Kristallstruktur von CYP2C5 nicht an der Ionenbrücke beteiligt.

β-Faltblatt 2 Es schließt sich die kurze SRS 5 an, die bei CYP2A5 mit M365 eine weitere der vier bekannten die Substratspezifität beeinflussenden Aminosäuren enthält. Strukturell schließen sich an SRS 5 vier Stränge aus zwei β-Faltblättern an (Strang 1-4 ▷ 2-1 ▷ 2-2 ▷ 1-3). Im ersten Strang liegt typischerweise eine basische Aminosäure. Im zweiten Strang findet sich ein stark konserviertes DTxxx-Motiv, gefolgt von einem xxxKG-Motiv im dritten Strang, wobei das Lysin als Bindungspartner der Reduktase, die mit den CYPs zusammenarbeitet, betrachtet wird. Im vierten Strang findet man meist eine saure Aminosäure, gefolgt von zwei hydrophoben.

K'-Helix Diese Helix enthält als Erkennungsmerkmal eine hydrophobe Aminosäure, auf die eine basische Aminosäure und ein invariantes Aspartat folgen.

Mäander-Region Dieser Abschnitt variiert in seiner Länge zwischen den Cytochromen der Klasse I und II. Bei den CYPs der Klasse II schließt sich an ein häufig auftretendes FxPERF-Motiv ein 6 - 7 Aminosäuren langer Loop an, der bei den prokaryotischen CYPs der Klasse I nicht vorkommt. Die räumliche Struktur, die diesem Abschnitt seinen Namen gegeben hat, lässt sich trotz des zusätzlichen nach außen ragenden Loops bei allen Kristallstrukturen wiederfinden. Die dreidimensionale Anordnung in diesem Bereich ist somit konserviert, obwohl sie sich keiner bekannten Sekundärstruktur zuordnen lässt. Im FxPERF-Motiv sind innerhalb der CYP2-Familie beide Phenylalanine sowie das Prolin invariant. Die anderen Aminosäuren sind nicht so streng konserviert. An Stelle des Arginin sitzt meist ein Histidin, das an der Ausbildung von Ionenbrücken im konservierten ExxR/(R/H)-Motiv nicht mehr beteiligt ist. Da der verlängerte Loop bei den Eukaryoten nach außen ragt und sich das konservierte Histidin nicht mehr an der stabilisierenden Ionenbrücke beteiligt, wird diese Region bei den eukaryotischen

CYPs als Bindungspartner für die Reduktase angesehen und dient weniger der Aufrechterhaltung der 3-D-Struktur.

Cystein-Tasche Der am besten konservierte Abschnitt in der Sequenz der Cytochrome P450 ist die Cystein-Tasche. Dieser Abschnitt von 10 Aminosäuren bildet das PROSITE-Motiv, das CYPs charakterisiert. Vier der zehn Aminosäuren (FxxGxxxCxG) sind invariant. Es handelt sich dabei um ein Phenylalanin, zwei Glycine und ein Cystein, das mit dem Häm-Eisen als fünfter Ligand koordiniert.

Helix L Die L-Helix beginnt sofort im Anschluss an die Cystein-Tasche und verläuft unterhalb des Häms. Sie enthält mehrere konservierte hydrophobe Aminosäuren, zusammen mit einem invarianten Glutamat. Das hydrophobe C-terminale Ende der Helix steht in engem Kontakt zur I-Helix und stabilisiert damit die 3-D-Struktur des Proteins.

β-Faltblatt 3/4 An die L-Helix schließt sich der dritte Strang des β-Faltblattes 3 an (3-1 befindet sich zwischen den Helices D und E), gefolgt von Faltblatt 4 (4-1 ▷ 4-2), das nicht gut konserviert und Teil von SRS 6 ist. In diesem Bereich liegt A481 aus CYP2A5 als vierte substratbeeinflussende Aminosäure. β-Strang 3-2 schließt die Sequenz schließlich ab.

6.1.3 Alignment

Aus den oben genannten Charakteristika der CYPs ergibt sich ein gemeinsames Alignment der Kristallstrukturen (s. Abb. 6.3). Mit Hilfe dieses Alignments und dem Wissen über markante, konservierte Aminosäuren lassen sich nun beliebige Cytochrom P450-Sequenzen in das Alignment integrieren und die für das Homologie-Modelling am besten geeignete Kristallstruktur herausfinden. Eine weitere Hilfe für die Integration neuer Sequenzen in das Alignment sind Sekundärstruktur-Vorhersagen, weil das Auffinden der konservierten Aminosäuren und Motive, in den in stets gleicher Reihenfolge auftretenden Sekundärstrukturen, durch eine Vorhersage wesentlich erleichtert wird. Für die Auswahl des Vorbildes bzw. der Vorbilder gibt es zwei Methoden. Entweder man sucht aus den möglichen Kristallstruktur-Vorbildern die jeweils passendsten Bereiche aus und nimmt somit mehrere Strukturen als Vorbild für sein

Modell ("Consensus"-Methode) oder man beschränkt sich auf ein Vorbild, das in allen Sequenzbereichen genutzt wird ("Replacement"-Methode).

6.1.4 Sekundärstruktur-Vorhersagen

Um einen weiteren Anhaltspunkt für das Alignment von CYP2A5 mit den Kristallstrukturen zu bekommen, wurden verschiedene Programme getestet, die für eine gegebene Proteinsequenz eine Vorhersage über deren Sekundärstruktur machen. Für diese Tests wurden die Sequenzen der bekannten Kristallstrukturen als Eingabeparameter genutzt und die Ergebnisse mit den aus den Kristallen bekannten Sekundärstrukturen verglichen. Zu Beginn der Arbeit waren nur die Kristallstrukturen von P450_{cam}, P450_{terp}, P450_{BM-3} und P450_{EryF} verfügbar.

Abbildung 6.4 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen am Beispiel von P450_{BM-3} (CYP102), dessen Resultate repräsentativ auch für die anderen CYPs stehen. Man erkennt, dass nicht alle Programme geeignet sind, Cytochrome P450 vorherzusagen. Während manche Regionen bei nahezu allen Vorhersagen richtig erkannt werden (Helices A, D, H), existieren auch Bereiche, in denen nur eine schlechte Übereinstimmung von Vorhersage und Kristallstruktur erkennbar ist (Helices B', E, F und I; Faltblattregion 3/4). Das Programm SSPAL [136, 137] lieferte die geringste Zahl nicht korrekt vorhergesagter Aminosäuren, dicht gefolgt von PSIPRED [138], das speziell in einigen Abschnitten schlechter war als SSPAL (Helices B' und F).

Nach Erscheinen der Kristallstruktur von CYP2C5 wurden Sekundärstrukturvorhersagen mit den neuesten Versionen von SSPAL und PSIPRED, den bis dato besten Programmen, auch für dieses Enzym durchgeführt. Es fiel auf, dass die SSPAL-Vorhersage sehr schlecht war. Die Vorhersage für die I-Helix stimmte nicht, die Helix E fehlte ganz und das Programm zeigte viel zu viele β -Faltblätter an. Eine daraufhin durchgeführte Wiederholung der SSPAL-Vorhersage mit SSPAL 2.0 für CYP2A5 ergab eine Verschlechterung der Resultate besonders im Bereich der Helices E, I und L. In der neuesten Version (SSPAL 2.0) hat offensichtlich die Vorhersagekraft für Cytochrome abgenommen. Die PSIPRED-Voraussagen lieferten weiterhin gute Ergebnisse. Abbildung 6.5 zeigt die Unterschiede der SSPAL und PSIPRED-Vorhersagen für CYP2C5 im Vergleich mit der Kristallstruktur.

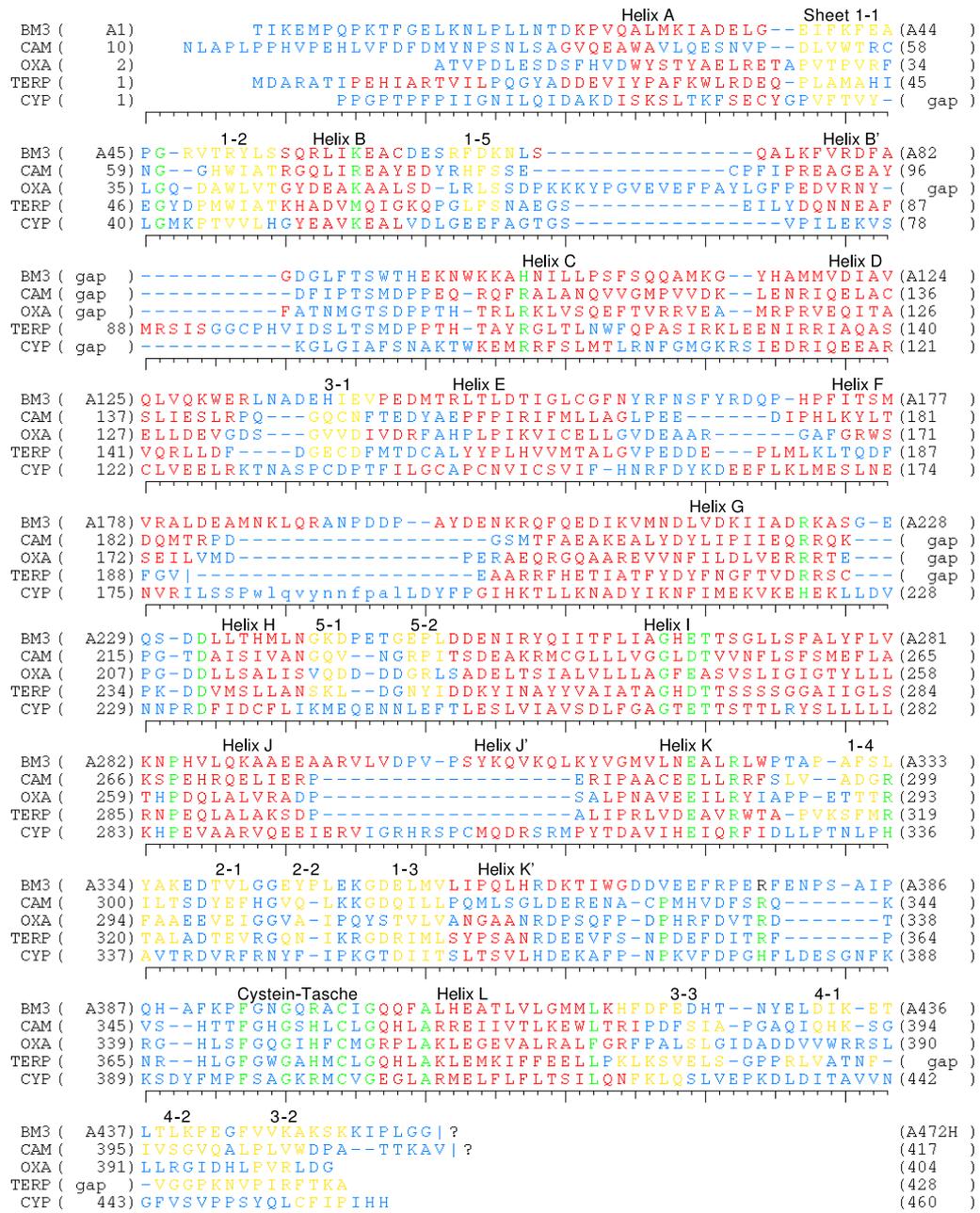


Abbildung 6.3: Alignment der Kristallstrukturen von BM-3 (CYP102), CAM (CYP101), OXA (EryF = CYP107A1), TERP (CYP108) und CYP (CYP2C5). Die Färbung der Sequenzen beruht auf der Sekundärstruktur (rot = α -Helix; gelb = β -Faltblatt) und der Kenntnis von bei allen CYPs konservierten Aminosäuren (grün). Aminosäuren, die im Alignment untereinander stehen, nehmen auch vergleichbare räumliche Positionen ein.

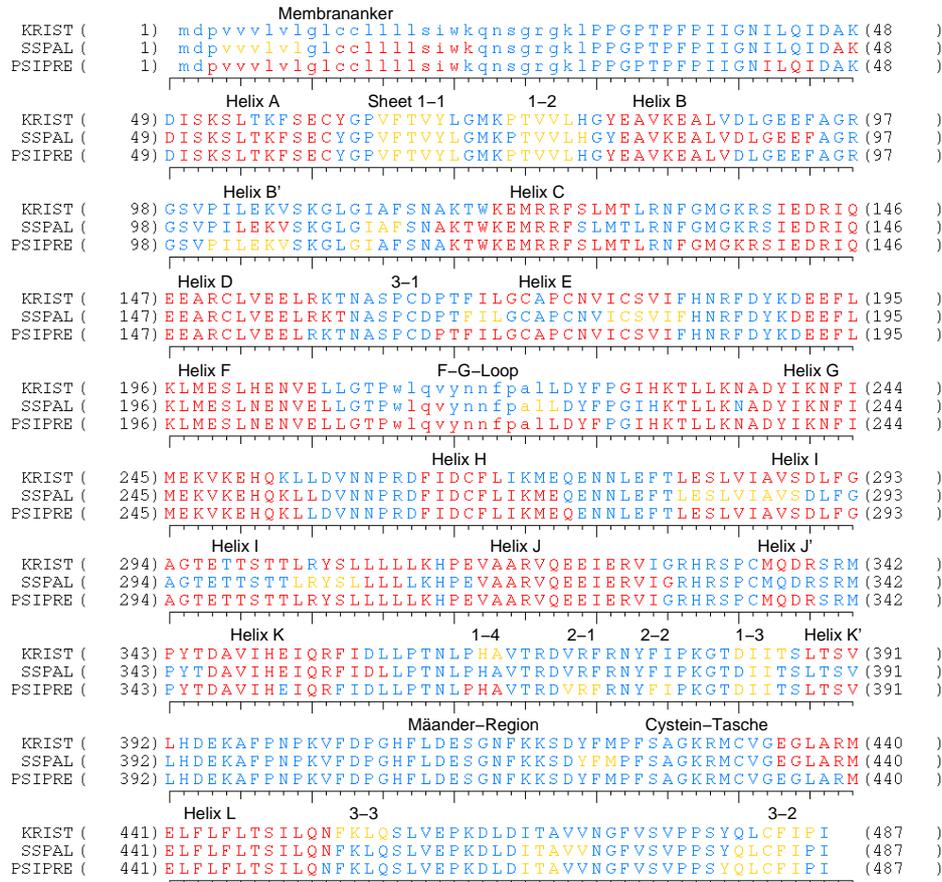


Abbildung 6.5: Vergleich der Sekundärstrukturelemente der Kristallstruktur (KRIST) von CYP2C5 mit den Vorhersagen der Programme SSPAL und PSIPRED (jeweils aktuellste Version). Beide Programme zeigen Ungenauigkeiten bei der Vorhersage der Helix B' und der Faltblattregionen 1 bis 3. SSPAL ist nicht in der Lage die gut konservierten Helices E und I zu erkennen. PSIPRED sagt konstant in allen Vorhersagen die F-Helix zu lang voraus. (rot = α -Helix; gelb = β -Faltblatt)

In den aktuellsten Versionen zeigen beide Programme Schwächen bei der Vorhersage der Region um die B'-Helix sowie bei den Faltblättern 1, 2 und 3. Die große Schwäche der neuen SSPAL-Version ist, dass es nicht in der Lage ist, die konservierten Helices E und I vorherzusagen. Deswegen kann SSPAL nicht mehr für die Vorhersage der Sekundärstruktur von Cytochromen P450 genutzt werden. PSIPRED ist als einziges der getesteten Programme in der Lage, die E-Helix korrekt zu erkennen. Auch die kleinen Helices J' und K' sind vorhanden. Neben der oben erwähnten Schwäche bei den Faltblättern und der B'-Helix sagt PSIPRED die F-Helix zu lang

voraus. Dieses Verhalten tritt aber bei allen Cytochrom-Strukturen auf und kann daher bei der Erweiterung eines Alignments um eine unbekannte Sequenz beachtet werden.

6.2 Auswahl der Modellsequenz

Wie schon in Kapitel 2.6 erwähnt, sollten in dieser Arbeit Modelle von CYP2A5 und CYP2A6 erstellt und miteinander verglichen werden. Beide Proteine sind hochhomolog (93 %), wobei die Sequenzidentität 87 % beträgt. Bei einer solch hohen Identität ist es möglich, das eine Enzym aus dem fertigen Modell des anderen abzuleiten.

Entscheidend für die Auswahl des zuerst zu bauenden Modells war die Menge an Informationen, mit denen das Modell auf seine Korrektheit überprüft werden konnte. Je mehr experimentelle Ergebnisse für das Enzym zur Verfügung stehen (z. B. als Bindungs- und Inhibitionskonstanten oder Angaben über die Umsetzungspositionen von Substraten in Mutationsstudien), desto besser und ausführlicher kann das Modell auf Fehler getestet werden. Nachdem ein Modell auf solche Weise validiert worden ist, kann man es in einem nächsten Schritt zur Vorhersage unbekannter Zusammenhänge benutzen oder auch zum Aufbau eines weiteren Enzyms.

Da für das Maus-Enzym CYP2A5 mehr interpretierbare Daten zur Verfügung standen als für die menschliche Variante CYP2A6, wurde zuerst ein stabiles und zuverlässiges Modell von CYP2A5 erstellt, das dann später als Vorbild für den Aufbau des wichtigeren CYP2A6-Modells diente.

6.3 Auswahl der Template

Am Anfang einer jeden Homologie-Modellierung steht die Auswahl möglicher Vorbilder (Template) und die Erstellung eines Alignments der Modellsequenz mit diesen Kristallstrukturen. Mit Veröffentlichung der Kristallstruktur von CYP2C5 zeigte sich, dass diese Struktur als alleiniges Templat für den Aufbau des CYP2A5-Modells dienen kann. CYP2C5 stammt aus derselben Familie wie CYP2A5. Die beiden Proteine sind zu 51 % identisch. Zwischen den bakteriellen Cytochromen und CYP2A5 liegt die Identität zwischen 14 und 18 %. Auch in der Länge der Sequenzen entsprechen

sich CYP2C5 und CYP2A5 besser, so dass nur zwei Loops in das Modell einzufügen waren.

Die zu Beginn der Arbeit erstellten Modelle, die auf einem Alignment mit den vier bakteriellen Kristallstrukturen beruhten ("Consensus"-Methode) (s. Abb. 6.6), lieferten keine befriedigenden Ergebnisse. Zwar wiesen sie eine stabile und zufriedenstellende Geometrie auf, konnten aber die vorgegebenen experimentellen Befunde nicht erklären.

Aus dem Alignment geht hervor, dass keine der Strukturen so gut passt, dass man diese als alleiniges Templat auswählen könnte ("Replacement"-Methode). Keine der Sequenzen stimmt in allen Bereichen gut genug mit der Sequenz von CYP2A5 überein. Die strukturkonservierten Bereiche (SCR²⁵), die in einem Alignment festgelegt werden müssen, wurden daher aus allen Kristallstrukturen gewählt, um das Modell aus den jeweils günstigsten Bausteinen zusammenzusetzen. Für SCRs, bei denen mehrere Kristallstrukturen gleich gut als Vorlage geeignet waren, wurde die Struktur von CYP107A1 (OXA) gewählt, da dieses Enzym mit Erythronolid B das größte Substrat der aufgeklärten Kristallstrukturen besitzt. Daher weist auch das aktive Zentrum von CYP107A1 das größte freie Volumen auf. Die Substrate von CYP2A5 (z. B. Corticosteron²⁶) besitzen ein mit Erythronolid B vergleichbares Volumen. Um ein aktives Zentrum im Modell zu erhalten, das für Substrate dieser Größe geeignet ist, wurde die Struktur von CYP107A1 möglichst oft benutzt.

Im Alignment erkennt man viele Lücken zwischen den SCRs, für die die Koordinaten aus den Kristallen übernommen wurden. Diese Lücken waren nicht mit Teilstücken aus den Templaten zu ergänzen (zu lange/kurze Loops, schlecht konservierte Sekundärstruktur) und mussten mit Loops aus anderen Proteinen verbunden werden. Eine solche Einfügung bildet immer eine Störstelle und verschlechtert die Qualität des Modells.

Die genaue Untersuchung der "Consensus"-Modelle ergab, dass das aktive Zentrum so groß war, dass die Substrate keine stabile Position einnehmen konnten, die eine Umsetzung ermöglicht hätte.

²⁵SCR = Structurally Conserved Region

²⁶Corticosteron wurde zur Validierung des Modells benutzt.

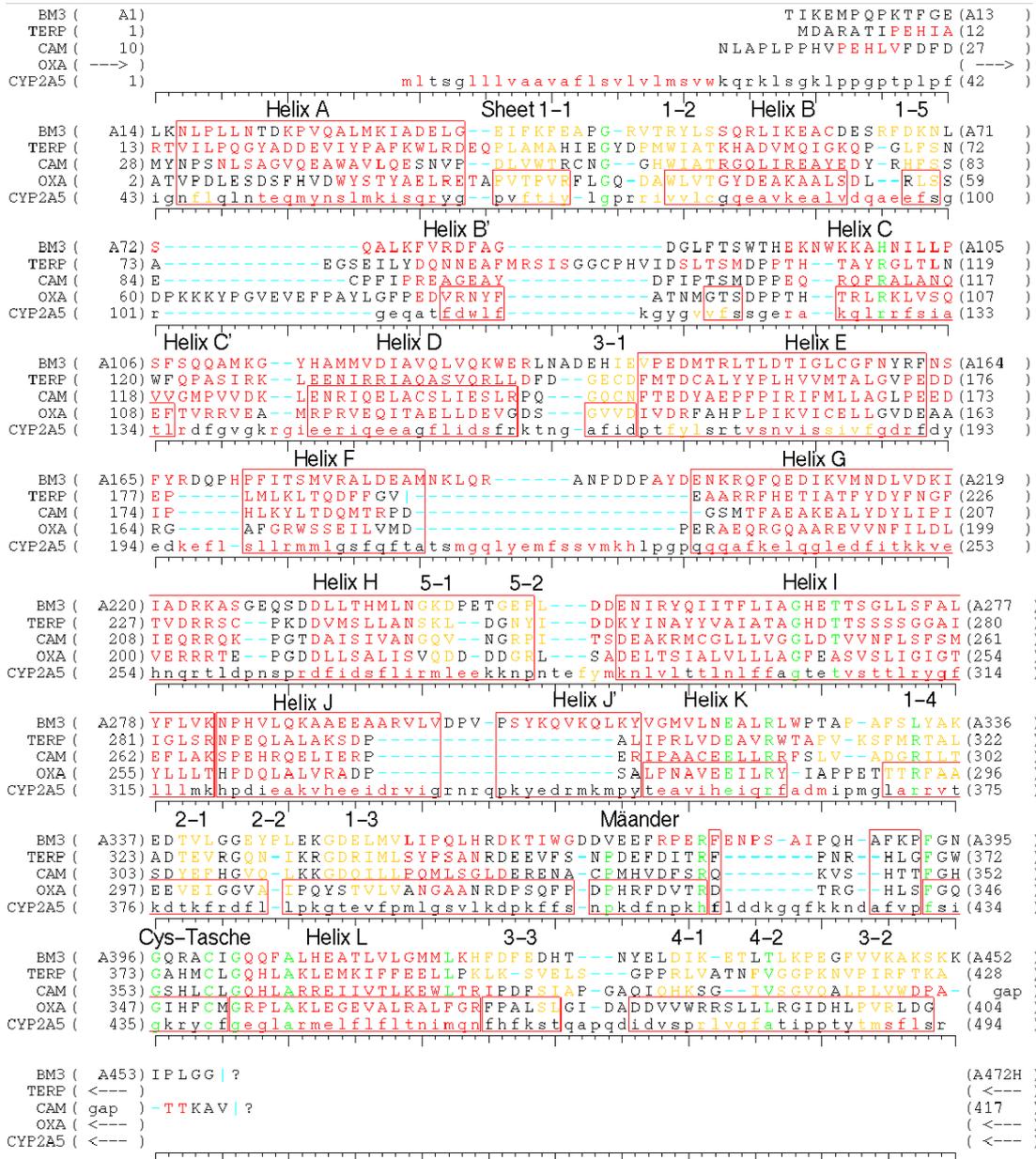


Abbildung 6.6: Alignment der CYP2A5-Sequenz mit den bakteriellen Kristallstrukturen. Bei den Kristallstrukturen steht rot für α -helicale Bereiche und gelb für β -Faltblätter. Grüne Aminosäuren sind über alle CYPs konserviert und dienten bei der Erstellung als Orientierungspunkte. Die Einfärbung der CYP2A5-Sequenz erfolgte nach der damals besten Sekundärstrukturvorhersage mit SSPAL. Die Kästen umrahmen die SCR, für die die Koordinaten von der jeweils obersten Sequenz in der Box übernommen wurden.

So wurde die "Replacement"-Methode angewendet und CYP2C5 als Templat benutzt. Das endgültige Alignment von CYP2A5 und CYP2C5 ist in Abbildung 6.7 dargestellt. Dank der großen Sequenzähnlichkeit dieser mikrosomalen Enzyme steht nicht zu erwarten, dass in diesem Fall die "Consensus"-Methode noch Vorteile gegenüber der jetzt verwendeten "Replacement"-Methode bietet.



Abbildung 6.7: Alignment von CYP2A5 und CYP2C5 (grün = identische Aminosäuren; gelb = homologe Aminosäuren). Umrahmt sind die Sequenzbereiche in denen die Koordinaten für das Modell von der Kristallstruktur übernommen wurden. Für Aminosäuren mit kleinen Buchstaben existieren keine Koordinaten (Membrananker und F-G-Loop bei CYP2C5). Bei der Modellsequenz wurden Koordinaten für diese Bereiche generiert bzw. nach einer Suche in der PDB-Datenbank von einem anderen Protein übernommen.

6.4 Modellaufbau

6.4.1 Strukturkonservierte Bereiche (SCR)

Bei der Erstellung eines Homologie-Modells werden nach Auswahl der Modellvorlage zuerst die Koordinaten für die strukturkonservierten Bereiche (SCR) übernommen. Die Größe dieser SCRs ist dabei vom Verwandtschaftsgrad und der Ähnlichkeit von Templat und Modell abhängig. Dank ihrer nahen Verwandtschaft (CYP2-Familie) und großen Ähnlichkeit der Sequenzen von CYP2A5 und 2C5 bezüglich ihrer Identität (51 %), Homologie (76 %) und Sequenzlänge (494 Aminosäuren bei CYP2A5 zu 487 AS bei 2C5) konnten fast alle Aminosäuren SCRs zugeordnet werden (s. Abb. 6.7). Die Modellsequenz übernimmt dabei direkt die Koordinaten für Atome des Proteinrückgrats (Backbone) und für identische Seitenketten. Koordinaten für nicht-identische Seitenketten werden, abhängig von den Winkeln im Backbone, aus einer Datenbank extrahiert und den Seitenketten-Atomen zugeordnet.

Koordinaten für nicht strukturkonservierte Bereiche wurden im Anschluss mit der "Loop-Search"-Routine des Programms INSIGHT II in das Modell integriert.

6.4.2 Strukturvariable Bereiche

Zu den strukturvariablen Bereichen (SVR²⁷) zählen alle Bereiche, denen aus einer Modellvorlage keine Koordinaten zugeordnet werden können. Gründe hierfür sind meistens die unterschiedliche Länge der entsprechenden Sequenzbereiche im Alignment oder das Fehlen bestimmter Koordinaten im Templat. Beide Möglichkeiten treffen hier zu.

In der Kristallstruktur von CYP2C5 konnte der relativ große F-G-Loop (21 Aminosäuren) auf Grund seiner großen Flexibilität, die sich in großen thermischen B-Faktoren für diese Region zeigt, kristallographisch nicht komplett erfasst werden. Die 11 fehlenden Aminosäuren mussten als SVR ins Modell eingefügt werden. Da auch der Membrananker in der Kristallstruktur nicht erfasst ist, wurde dieser Bereich nicht

²⁷SVR = Structurally Variable Region

modelliert. Die ersten 40 Aminosäuren der Sequenz, die den Membrananker und einen Teil der Polyprolin-Region enthalten, wurden abgeschnitten (s. Kap. 6.1.2).

Im Übergang von Helix H zur Helix I weist CYP2A5 einen Einschub (Insertion) von 3 Aminosäuren auf, der bei CYP2C5 nicht vorhanden ist. Um diese Insertion zu modellieren, wurden im Bereich vor der Insertion vier weitere Aminosäuren einem SVR zugeordnet und für alle sieben Aminosäuren ein passender Loop gesucht.

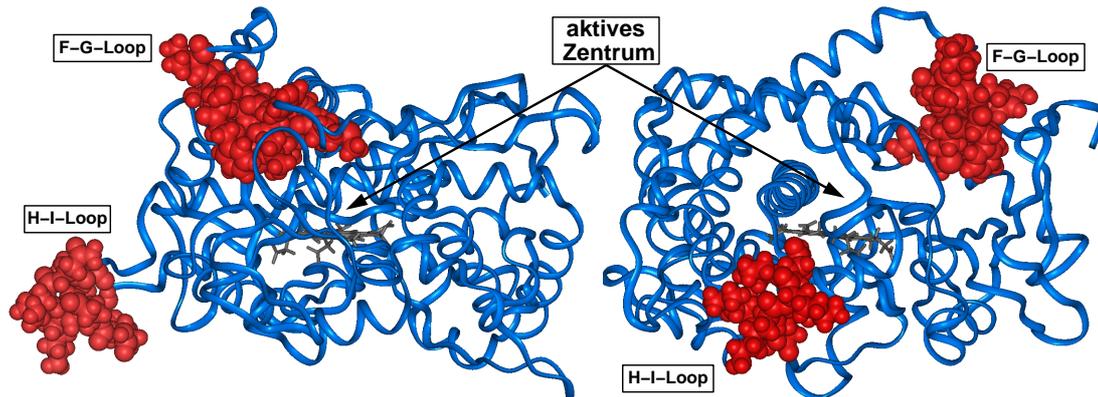


Abbildung 6.8: Lage der SVRs im Modell von CYP2A5. Links in Frontalansicht; rechts in Seitenansicht. Dargestellt sind nur das Proteinrückgrat (blau) und die Loopbereiche mit allen Atomen (rot). Das Häm ist mit Stäbchen in grau abgebildet. Beide Loops liegen an der Oberfläche des Proteins und zeigen keine direkte Interaktion mit dem aktiven Zentrum.

Die Modellierung von Loop-Regionen ist erfahrungsgemäß problematisch. Die SVRs sind nicht konserviert und zeigen keine charakteristische Struktur. Meist liegen sie an Proteinoberflächen und sind durch extensive Kontaktmöglichkeiten mit der Umgebung sehr flexibel. Je größer die SVRs sind, desto größer wird die Zahl der möglichen Konformationen und desto größer ist ihre Flexibilität. Die in das Modell eingefügten SVRs sind in Abbildung 6.8 dargestellt und liegen an der Oberfläche des Proteins. Sie zeigen keine direkte Interaktion mit dem aktiven Zentrum.

Da das Ziel dieser Arbeit darin bestand, die Substratspezifitäten der CYPs 2A5 und 2A6 zu untersuchen und zu erklären, wurde die relativ grobe Routine des "Loop-Search" aus dem HOMOLOGY-Modul des INSIGHT II Programmpakets für die Suche und den Einbau der SVRs verwendet. Bei dieser Suche wird aus den Koordinaten der C α -Atome vor und hinter der Lücke (Prä- und Postflex-Bereich) im Alignment eine

Abstandsmatrix gebildet und diese Matrix mit den Kristallstrukturen aus der PDB [16] verglichen. Die zehn Strukturen, die den Suchkriterien am besten entsprechen, werden angezeigt und einer optischen Kontrolle unterzogen. Die optische Auswertung wurde immer mittels einer Stereo-Betrachtung durchgeführt. Tabelle 6.1 zeigt die Strukturen und Positionen der Loops, die in das Modell eingebaut wurden.

Tabelle 6.1: Angabe der Suchkriterien der "Loop-Search"-Routine bei der Suche in den Strukturen der PDB-Datenbank. Die in das Modell von CYP2A5 eingefügten Loops sind mit der Angabe ihrer Position in der Kristallstruktur genannt.

SVR in CYP2A5	Präflex	Postflex	ausgewählte PDB-Struktur	ab AS
F-G-Loop (M216→V226)	5	5	1MHZ	D447
H-I-Loop (L276→P282)	2	2	1MHL	A12

6.4.3 Energie-Minimierung der Loops

Bei der Energie-Minimierung der Loops sollen ungünstige Kontakte und Bindungen, die sich durch den Einbau der Loops ergeben haben, verbessert werden, ohne dabei die Struktur der SCRs zu stark zu verändern. Es werden daher die einzelnen Fehlerquellen bzw. Störstellen nacheinander betrachtet und verbessert. Dieses Vorgehen ermöglicht ein für jede Fehlerquelle zugeschnittenes Verfahren der Beseitigung. Die Reihenfolge richtet sich nach der Schwere der möglichen Fehler.

Splice-Repair Beim Einbau der Loops in die SVRs ergeben sich oft ungünstige Geometrien an den Verknüpfungsstellen (splice-points). Die im Programm erstellten Bindungen entsprechen nicht der normalen Länge einer Peptid-Bindung (1,32 Å), und der Torsionswinkel weicht von seinem Idealwert von 180° ab. Mit der "Splice-Repair"-Routine wird versucht, diese Parameter zu verbessern. Hierzu wird in einer Energie-Minimierung nur den direkt an der neuen Peptidbindung beteiligten Atomen die Möglichkeit gegeben, sich besser auszurichten. Alle anderen Atome des Modells bleiben in ihren Positionen fixiert und die ungünstige Länge der Bindung gleicht sich an die normale Länge an. Gleichzeitig wird der Torsionswinkel der Peptidbindung mit einer

frei wählbaren Kraft auf den Wert von 180° gedrückt. Die Parameter der beim Einbau und der Minimierung der Loops verwendeten Routinen sind in Tabelle 6.2 aufgeführt.

Relax Die "Relax"-Routine bietet die Möglichkeit, ein Homologie-Modell in mehreren Schritten zu entspannen. Dazu werden mehrere aufeinanderfolgende Minimierungen durchgeführt, bei denen immer größere Teile der Struktur freigelassen werden. Diese Minimierungen beziehen sich auf alle neuen Elemente einer Struktur (Loops und mutierte Seitenketten). Das Backbone in strukturkonservierten Bereichen wird an diesem frühen Punkt des Modellbaus noch nicht verändert.

Tabelle 6.2: Übersicht über die beim Minimieren des Modells verwendeten Parameter in den Routinen des INSIGHT II-Programmpakets.

Routine	Minimierungsschritte	Kraftkonstante [$kcal \cdot mol^{-1}$]	bewegliche Atome
Splice Repair	400	400	Splice-Punkte
Relax	200	50	Loop-Seitenketten (1)
	200	50	alle Loop-Atome (2)
	200	100	mutierte SCR-Seitenketten (3)
	200	100	alle SCR-Seitenketten (4)
	100	100	1 - 4

Nach der kompletten Durchführung der beiden Routinen hatten sich alle Überlappungen von mutierten Seitenketten aufgelöst. Es blieben noch ungünstige Kontakte durch zu kleine Distanz zwischen einzelnen Atomen, die auf Grund von Platzproblemen (das Proteinrückgrat war fixiert) und einer ungünstigen Auswahl von Seitenkettenkonformationen mit einer Energie-Minimierung nicht zu lösen waren. In einem späteren Schritt wurden daher mit dem Programm SCWRL diese ungünstigen Seitenkettenkonformationen gezielt untersucht. Zuvor musste, um die sterischen Gegebenheiten im aktiven Zentrum richtig wiederzugeben, noch das Co-Enzym ins aktive Zentrum eingefügt werden.

6.4.4 Einbau des Häm

Nach Aufbau des Proteinteils von CYP2A5 und einer ersten Energieminimierung wurde im nächsten Schritt die prosthetische Gruppe (Häm) in das Protein integriert. Die Häm-Koordinaten wurden aus der Schablone CYP2C5 übernommen und um die fehlenden Wasserstoff-Atome ergänzt. Das Häm ist kovalent über das Schwefelatom eines Cysteins an den Proteinteil gebunden. Bei CYP2A5 erfolgt dies durch Cystein 399.

6.4.5 Verbesserung der Seitenketten-Konformationen

Durch den Austausch der nicht-identischen Seitenketten beim Bau eines Homologiemodells können sehr ungünstige Überlappungen der neuen Seitenketten mit anderen Teilen des Modells entstehen. Mit Hilfe des Programms SCWRL wurde die Position aller mutierten Seitenketten überprüft [139]. Die Koordinaten des Protein-Backbones und der identischen Seitenketten blieben erhalten. SCWRL generiert für die mutierten Aminosäuren mit Hilfe einer Datenbank alle in der Natur häufiger auftretenden Konformationen der Seitenketten und überprüft die entstehenden Strukturen auf ungünstige Wechselwirkungen zwischen Seitenketten- und Backbone-Atomen sowie Seitenketten-Atomen untereinander. Die Anzahl ungünstiger Kontakte wird durch die Auswahl der günstigsten Kombination der Seitenkettenkonformation minimiert.

6.5 Modelloptimierung

Nach dem Aufbau bestehen in der Struktur noch immer gespannte Bereiche. Um diese Spannungen abzubauen und um ein möglichst natürliches Modell zu erhalten, wurde das Protein durch Moleküldynamiken in einer Wasserbox weiter verbessert.

6.5.1 Die Wasserbox

Die Berechnung von Moleküldynamiken ganzer Proteine ist sehr rechenaufwändig. In früheren Arbeiten mussten daher meist Kompromisse zwischen Rechnerkapazität und Realitätsnähe der Simulation eingegangen werden, denn die Summe der zu be-

rechnenden Wechselwirkungen steigt proportional mit jedem Atom, das in die Rechnung einbezogen wird. Die Berechnung von globulären Proteinen in ihrer natürlichen wässrigen Umgebung ist erst durch die enorme Steigerung der Rechnerleistung in den letzten Jahren und die Verbesserung der Rechenalgorithmen möglich geworden. Mit GROMACS [111] steht ein Programmpaket zur Berechnung von Moleküldynamik-Simulationen zur Verfügung, das die Berechnung eines Proteins in einer annähernd physiologischen Umgebung ermöglicht.

Das Protein wurde dazu in einer Box mit einer Kantenlänge von 7,37 : 7,83 : 6,38 nm zentriert. Die Kantenlänge ergibt sich nach Vergrößerung der Minimalbox, die das Protein genau umschließt, um 0,5 nm in jede der drei Raumrichtungen. Die Vergrößerung der Box ist nötig, weil mit periodischen Randbedingungen gearbeitet wurde. Bei diesen Randbedingungen ist die zu untersuchende Box von 26 eigenen Spiegelbildern umgeben. Damit ein am Rand des Proteins gelegenes Atom keine Wechselwirkungen mit Proteinatomen der nächsten Box eingeht, muss der Abstand jedes Proteinatoms mindestens dem halben Radius entsprechen, der für die Berechnung der van-der-Waals- und elektrostatischen Interaktionen genutzt wird (0,9 nm in diesen Dynamiken; s. Tab. 6.3).

Um eine physiologische Umgebung für das Protein zu simulieren und die elektronische Neutralität des Gesamtsystems zu gewährleisten, wurden in die Box noch 37 Natrium-Ionen und 20 Hydrogenphosphat-Ionen eingebracht. Anschließend wurde die Box mit Wasser gefüllt, wobei jedes Wassermolekül, dessen Abstand zu einem Ion oder Protein-Atom kleiner ist als die Summe der van-der-Waals-Radien, aus der Box entfernt wurde. Für die Simulation wurde SPC-Wasser²⁸ verwendet. Dabei werden, um Rechenzeit zu sparen, für den Wassersauerstoff Coulomb- und Lennard-Jones-Wechselwirkungen berechnet, während die Wasserstoff-Atome nur Coulomb-Wechselwirkungen eingehen. Parameter für die Beschreibung des Häm-Moleküls wurden von Wade und Schappach übernommen [107, 119] (s. Kap. 5.1.2).

Das resultierende Gesamtsystem bestand aus insgesamt 34621 Atomen, wobei 4857 Protein-Atome aus 454 Aminosäuren und einem Häm stammen, 157 Atome aus Natrium- und Hydrogenphosphat-Ionen und 29607 Atome aus 9869 Wassermolekülen. Abbildung 6.9 zeigt das gesamte System im Überblick.

²⁸SPC: Single Point Charge

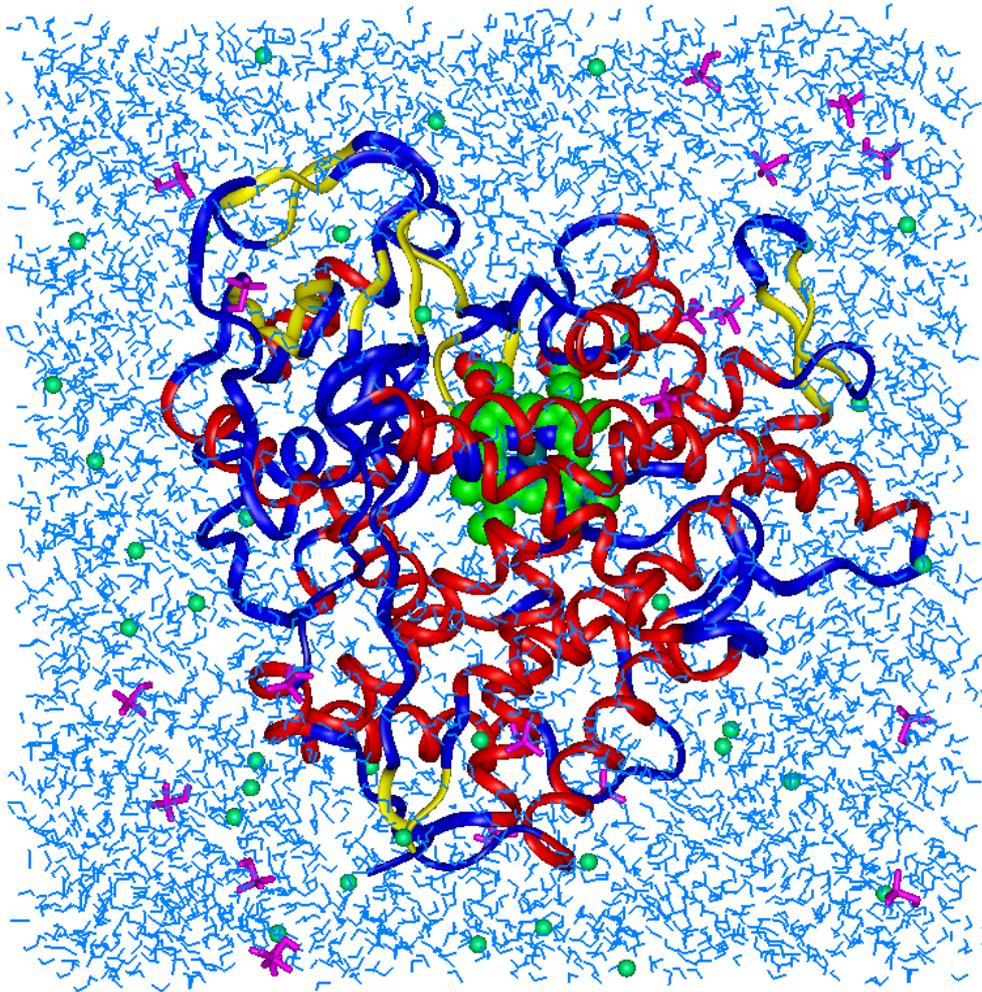


Abbildung 6.9: Ribbon-Ansicht des CYP2A5-Modells in der Wasserbox. In der Mitte als Kalottenmodell das Häm-Molekül. Als Kugeln dargestellt sind die Natrium-Ionen und als magenta farbige Stäbchen die Hydrogenphosphat-Ionen. Das Protein-Ribbon ist nach der Sekundärstrukturvorhersage mit dem Programm PSIPRED eingefärbt.

6.5.2 Äquilibrierung

Um durch das Einfügen des Wassers und der Ionen entstandene ungünstige Kontakte aufzuheben wurde das System nochmal energieminimiert. Durch Einbeziehung des Wassers in das Gesamtsystem mussten jetzt bei der Minimierung keine Teile der Struktur mehr fixiert oder getethert²⁹ werden. Da die Wassermoleküle in die Box zwar in

²⁹tethern: Belegung eines oder mehrerer Atome während einer Dynamik oder Minimierung mit einer Rückstellkraft frei definierbarer Stärke.

korrekter Dichte, aber in unphysiologischer regelmäßiger Anordnung eingefügt wurden, musste den Wassermolekülen die Gelegenheit gegeben werden eine günstigere Verteilung einzunehmen. Daher wurde die Wasserbox bei 310 K für 100 ps äquilibriert. Während der Äquilibration waren alle Nicht-Wasserstoffatome von Protein und Häm mit einer Kraftkonstante von jeweils $1000 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$ in den drei Raumrichtungen auf ihre Startposition getethert. So hatten die frei beweglichen Wassermoleküle die Möglichkeit, das Protein zu solvatisieren und Wasserstoffbrücken-Bindungen innerhalb und außerhalb des Proteins auszubilden. Nach den 100 ps war die regelmäßige Struktur des Wassers aufgehoben. Die Solvatisierung des Proteins war schon nach 25 ps auf einem Niveau, dass nur durch die Freigabe der Proteinbeweglichkeit noch leicht angehoben werden konnte (s Abb. 6.10).

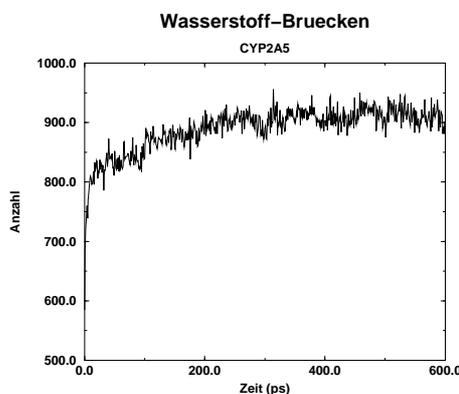


Abbildung 6.10: Anzahl der Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen Protein und Wassermolekülen des CYP2A5-Modells. Nach steilem Anstieg zu Beginn mit der Freigabe der Wassermoleküle (0-100 ps) steigt die Anzahl der Bindungen langsam mit der Freigabe des Proteins bis auf einen konstanten Wert im frei beweglichen System (400-600 ps) an.

6.5.3 Dynamik

Das Ziel von Dynamik-Simulationen ist es, das simulierte System ohne zusätzliche Kräfte von aussen in ein stabiles Gleichgewicht zu bringen in dem alle experimentell bestimmbar Parameter möglichst genau erfüllt werden. Die Abwesenheit von Rückhaltekräften war bei den bisherigen Berechnungen noch nicht gegeben. Bei den durchgeführten Minimierungen bewegen sich die Protein-Atome (auch ohne Fixierung

gen und Tethering) nur in Bereichen sehr ungünstiger Wechselwirkungsenergien, und bei der durchgeführten Wasserbox-Äquilibration war die Beweglichkeit des Proteins durch sehr hohes Tethering stark eingeschränkt. Um dem Protein seine volle Beweglichkeit zu gewähren, dabei aber nicht Gefahr zu laufen im Modell durch zu schnelle Freigabe Artefakte durch zu schnelle Bewegungen zu generieren, wurde die Tethering-Konstante in aufeinanderfolgenden Dynamiken von jeweils 100 ps langsam von 1000 auf 500, 200 und 100 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$ abgesenkt. Im Anschluss wurden freie Dynamiken bei 310 K für 1500 ps (1,5 ns) berechnet.

Um die Qualität des CYP2A5-Modells abzuschätzen, wurden Dynamiken mit zwei Kristallstrukturen (OXA, CYP2C5) bei vergleichbaren Bedingungen (Einbettung in eine Wasserbox ▷ Minimierung ▷ Wasseräquilibration ▷ Dynamik mit abnehmendem Tethering ▷ freie Dynamik) berechnet. Tabelle 6.3 zeigt die bei allen Dynamiken verwendeten Parameter im Überblick.

Tabelle 6.3: Auflistung der bei den Dynamiken verwendeten Parameter.

Integrationsschritt	1 fs
Simulationstemperatur	310 K
Intervall für die Archivierung (Geschwindigkeit)	1000 fs (1 ps)
Intervall für die Archivierung (Energie)	500 fs (0,5 ps)
Berechnungsmethode elektrost. Wechselwirkungen	PME ^a
Berechnungsradius	9 Å
Abstand im Fourier-Transformations-Gitter	0.12 nm
PME-Interpolierungsordnung ^a	kubisch
FFT-Optimierung	ja
Berechnungsmethode für vdW-Wechselwirkungen ^b	Cut-off
Berechnungsradius	9 Å
Wärmebad	ja
Druckregulierung	isotropisch
Generierung von Anfangsgeschwindigkeiten	nur bei Wasserboxäquilibration
Zufallszahl bei Generierung	173
Constraints	Wasserstoffbindungen
Berechnungsalgorithmus (Constraints)	LINCS
Wassermodell	SPC

^a PME = Particle Mesh Ewald; ^b vdW = van der Waals

Die Qualität des CYP2A5-Modells im Vergleich mit den Modellen aus den Kristallstrukturen wird im nächsten Kapitel untersucht. Hier zeigt sich auch, warum die

relativ zeitaufwändige Variante mit langsam abnehmenden Constraints an Stelle einer sofortigen Freigabe nach der Wasserbox-Äquilibration gewählt wurde. Vergleichende Dynamiken an einer Kristallstruktur ergaben, dass die Änderungen im Protein mit der vorsichtigen Variante geringer und die Qualität der Struktur besser waren (vgl. Tab. 6.4).

6.6 Kontrolle des Modells

Um einen Vergleich für die durch Dynamiken erhaltenen Geometrien des CYP2A5-Modells zu erhalten, wurden in gleicher Weise Simulationen von zwei Kristallstrukturen (OXA, CYP2C5) erstellt. Die Kristallstruktur von P450_{OXA} konnte sofort in eine Wasserbox im Programm GROMACS eingebracht werden. Bei der Kristallstruktur von CYP2C5 musste, analog dem Aufbau des CYP2A5-Modells, noch der nicht kristallisierte F-G-Loop eingebaut werden. Es wurde hierzu der gleiche Loop wie im CYP2A5-Modell verwendet.

6.6.1 Analyse der berechneten Energieinhalte

Wie die Kurvenverläufe in Abbildung 6.11 zeigen, steigt die potentielle Energie bei der Absenkung der Restraints von 1000 auf $500 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$ nach anfänglich konstantem Verlauf an, sinkt dann aber kontinuierlich ab und pendelt sich nach ca. 100 ps freier Dynamik auf einen konstanten Wert ein. Bei der 1,5 ns langen Dynamik des Modells bestätigt sich die bei den beiden Kristallstrukturen auf Grund der kürzeren Simulationsdauer nur zu vermutende Äquilibration des Systems nach etwa 100 ps freier Dynamik (500 ps auf der Zeitskala). Das System hat also schon nach 500 ps Gesamtrechnzeit eine energetische Äquilibration erreicht, die zum Beispiel mit Temperaturstabilität einhergeht. Das Modell zeigt hier also keine Unterschiede zu den Dynamiken der Kristallstrukturen.

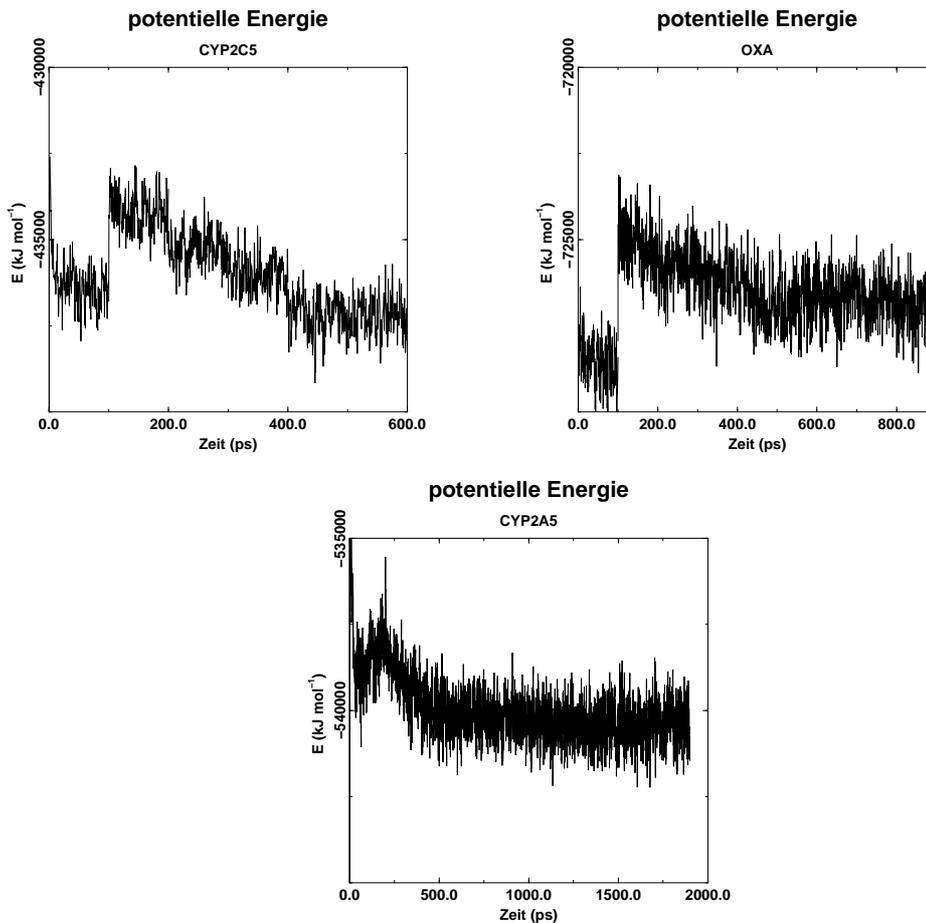


Abbildung 6.11: Verlauf der potentiellen Energie der Systeme

6.6.2 RMSD-Wert

Als weiteres Kriterium für das Ausmaß der Bewegungen eines Proteins während einer Dynamik dient der RMSD³⁰-Wert des Proteinrückgrats (Backbone), der die Positionsabweichung jedes Atoms im Backbone im Vergleich zur Startposition wiedergibt. Zu Beginn der Dynamik ist erkennbar, wie die Abweichungen in Stufen analog der Reduzierung der Constraints zunehmen (s. Abb. 6.12). Am Ende der freien Dynamik der CYP2C5-Struktur scheint sich der Anstieg zu verlangsamen und auf einen Wert von etwa 0,2 nm einzupendeln. Die Dynamik mit der OXA-Kristallstruktur bewegt sich bis 900 ps konstant auf einem Niveau von etwas über 0,1 nm. Bis 900 ps (500 ps freie Dynamik) bleibt auch das CYP2A5-Modell auf einem konstanten Wert von etwa 0,13 nm,

³⁰RMSD = Root Mean Square Deviation = mittlere quadratische Abweichung

aber danach zeigt sich nochmals eine Bewegung im Protein und ab 1200 ps schwankt der RMSD-Wert für die restlichen 700 ps um 0,19 nm.

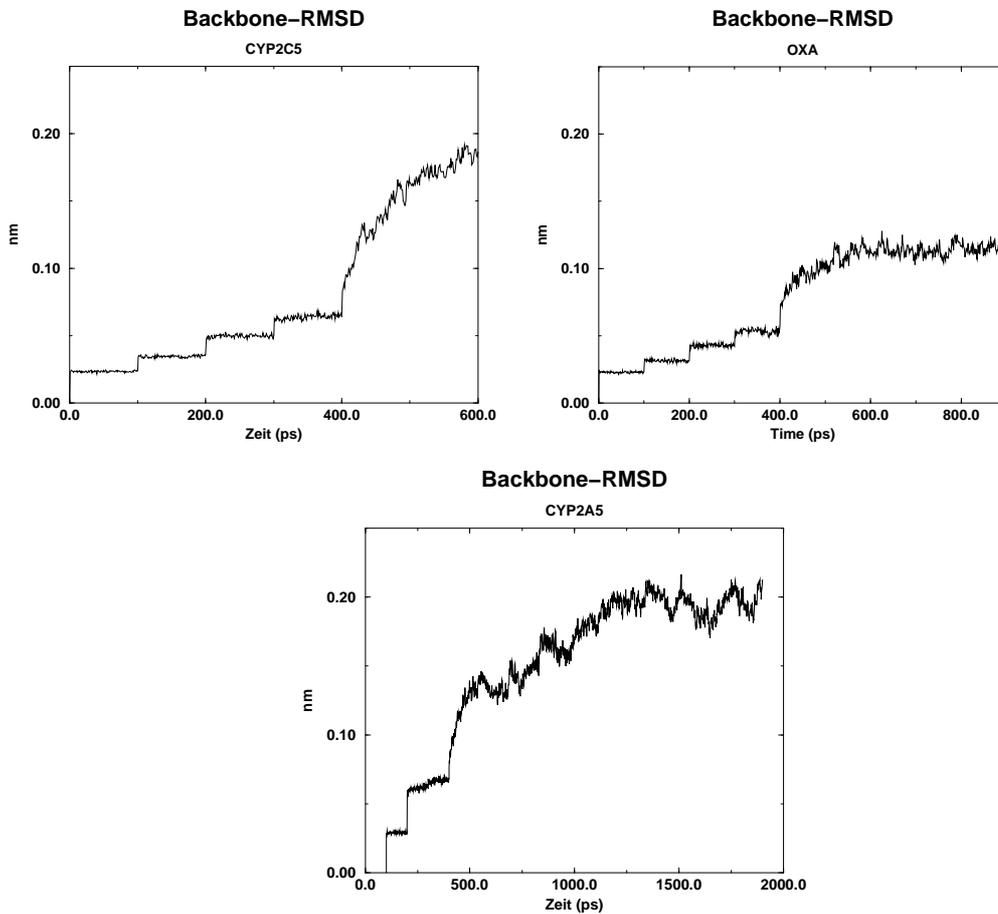


Abbildung 6.12: RMSD-Wert-Abweichungen des Proteinrückgrats von der Startstruktur während der Dynamiken der Kristallstrukturen CYP2C5 (links oben), OXA (rechts oben) und dem Modell von CYP2A5 (unten).

Die Abweichungen des Backbones beim CYP2A5-Modell sind nach 200 ps freier Dynamik kleiner als bei der CYP2C5-Kristallstruktur. Die geringsten Abweichungen von ihrer Startstruktur liefert die OXA-Dynamik. Der Unterschied zwischen CYP2C5 und dem CYP2A5-Modell auf der einen und OXA auf der anderen Seite liegt in einem modellierten Loop, der in beiden mikrosomalen Strukturen nötig war und daran, dass beide Enzyme eigentlich membranständig sind. In diesen Bereichen ergeben sich größere Veränderungen, die sich auch im RMSD-Wert zeigen. Wie Abbildung 6.13 zeigt, sind die RMSD-Änderungen für die Backbone-Atome der Aminosäuren, die das akti-

ve Zentrum von CYP2A5 bilden, kleiner und liegen in derselben Größenordnung wie bei P450_{OXA}.

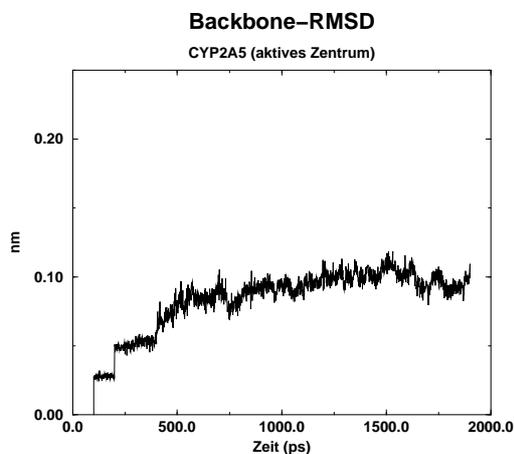


Abbildung 6.13: RMSD-Wert Änderung im Proteinerückgrat von allen am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligten Aminosäuren von CYP2A5.

6.6.3 Proteingeometrie (PROCHECK)

Bei der Anwendung von Molekül-Dynamik-Simulationen auf Proteine muss auf die Erhaltung günstiger Proteingeometrien besonderes Augenmerk gelegt werden, um sicher zu stellen, dass die verwendeten Kraftfeldparameter in der Lage sind die allgemeine Geometrie von Proteinen genau genug wiederzugeben. Zur Überprüfung der Geometrie wurde das Programm PROCHECK genutzt [140]. Als ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung einer Proteinstruktur dient die $\Phi - \Psi$ -Winkelverteilung (Ramachandran-Plot), die alle auftretenden Kombinationen dieser Backbone-Winkel in favorisierte, günstige, weniger günstige und ungünstige³¹ Kombinationen einteilt, wobei die Auswertung auch grafisch erfolgen kann. Dieser und andere Protein-Parameter werden von PROCHECK zu so genannten G-Faktoren verarbeitet.

Neben dem Vergleich der Kristallstrukturen mit den Kristallstruktur-Modellen und dem CYP2A5-Modell wurde so auch die Vorgehensweise getestet, die zur Verwen-

³¹„Ungünstige“ Kombinationen von $\Phi - \Psi$ -Winkeln kommen in der Natur in fast jedem Protein vor und sind energetisch ungünstig, weil sie geringe Atom-Abstände erzwingen, die allerdings gesamtstrukturell notwendig sind.

derung der langsam abnehmenden Constraints führte, denn ein sofortiges Freilassen der Protein-Atome führte zu einer größeren Anzahl an Aminosäuren deren $\Phi - \Psi$ -Winkel in ungünstigen Regionen liegen (s. Tab. 6.4).

Tabelle 6.4: Auswertung des Ramachandran-Plots der minimierten Strukturen von CYP2C5 vor und nach der Dynamik. Das CYP2A5-Modell wurde nach der Dynamik untersucht.

	CYP2C5				CYP2A5
	vor Dynamik Kristall- struktur	komplettes Modell	nach Dynamik schnelle Freigabe	nach Dynamik langsame Freigabe	nach Dynamik langsame Freigabe
minimiert vor Berechnung	nein	ja	ja	ja	ja
Wasserboxäquilibrierung	–	–	100 ps	100 ps	100 ps
abnehmende Constraints	–	–	–	3 × 100ps	3 × 100ps
freie Dynamik	–	–	600 ps	200 ps	1500 ps
PROCHECK					
favorisierte Regionen	71,3 %	79,5 %	76,7 %	78,0 %	80,2 %
günstige Regionen	23,4 %	17,6 %	18,8 %	18,3 %	16,8 %
weniger günstige Re- gionen	3,6 %	0,7 %	2,2 %	2,0 %	1,5 %
ungünstige Regionen	1,8 %	2,2 %	2,2 %	1,7 %	1,5 %

Zur Analyse, welche Aminosäuren in ungünstigen Regionen liegen, dient beispielhaft der in Abbildung 6.14 dargestellte Ramachandran-Plot der minimierten Proteinstruktur der CYP2A5-Dynamik nach 1,4 ns freier Dynamik (1,8 ns Gesamtdynamik), der im weiteren Verlauf der Arbeit für die Berechnung von Dynamiken mit Ligand verwendet wurde. In dieser Struktur liegen nur vier Aminosäuren (1 %) im ungünstigen Bereich. Bei genauerer Untersuchung der Struktur zeigt sich, dass Phe118 und Ser119 in einem Turn liegen, der einem Beta-Haarnadel-Turn ähnelt. Aminosäuren in solchen Turn-Strukturen weisen häufig energetisch ungünstige Konformationen auf [141].

Knapp innerhalb des ungünstigen Bereiches liegt Leu110. Das Homologie-Analogon aus der CYP2C5-Struktur (Val106) liegt schon im weniger günstigen Bereich. Man kann daher schließen, dass dieser Bereich bei mikrosomalen CYPs energetisch ungünstig ist und auch in Modellen nicht verbessert dargestellt werden kann. Die vier-

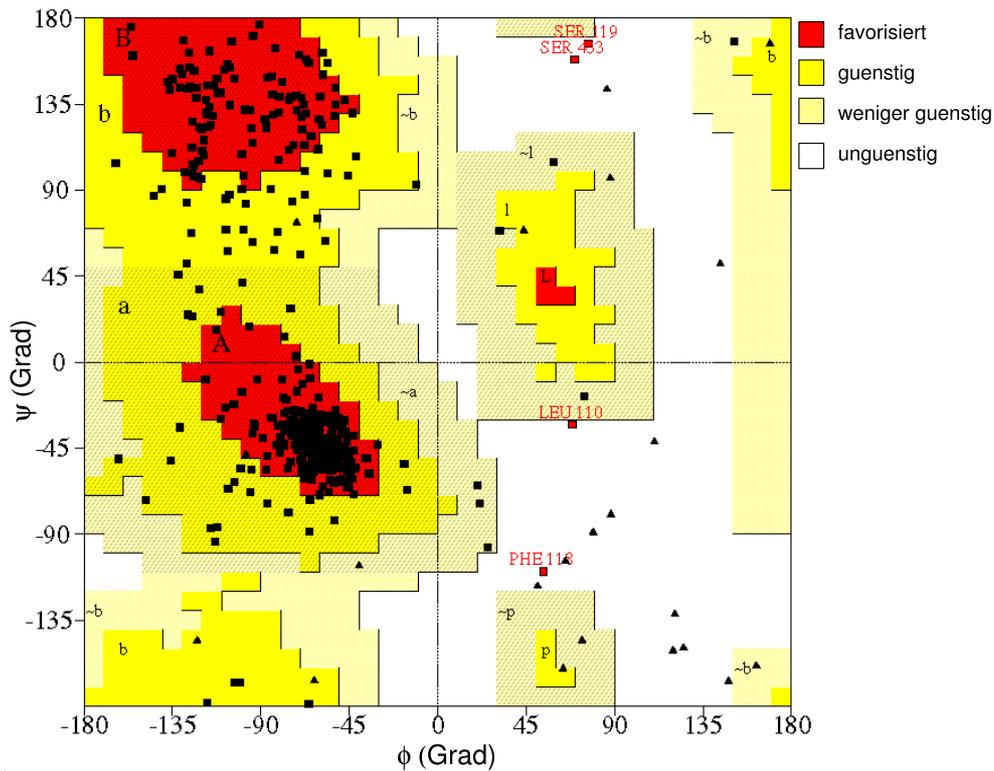


Abbildung 6.14: Ramachandran-Plot des CYP2A5-Modells nach 1400 ps freier Dynamik und Minimierung.

te Aminosäure Ser433 liegt im Mäander-Bereich kurz vor der Cystein-Bindungstasche. Die Mäander-Region ist wichtig für die korrekte Anordnung des Häm-bindenden Cysteins und liefert auch selbst Kontakte zum Häm. Das Homologie-Vorbild zeigt in dieser Position (426) ebenfalls ein Serin, das mit einer der Propionat-Seitenketten des Häm wechselwirkt und im "noch erlaubten" Bereich liegt. Im Modell ist in diese Bindung ein Wassermolekül eingeschoben und die Interaktion mit dem Häm ist nur noch indirekt. Also bewirkt diese Wasserstoffbrücken-Bindung die Stabilisierung von Ser433 in einer energetisch ungünstigen Konformation.

Ein weiteres Bewertungskriterium für die Qualität einer Proteinstruktur ist das Auftreten von Aminosäuren in cis-Konfiguration. Von den 20 natürlichen Aminosäuren kommt nur Prolin häufiger in cis-Konfiguration vor. Im CYP2A5-Modell erkennt PROCHECK eine cis-Aminosäure. Es handelt sich um Pro231, das in seiner cis-Konformation schon von Pro227 in CYP2C5 übernommen worden ist.

Die weiteren von PROCHECK überprüften Parameter des CYP2A5-Modells im Vergleich zu den OXA- und CYP2C5-Kristallstrukturen und -Modellen listet Tabelle 6.5 auf. Bei der Betrachtung der einzelnen Ergebnisse fällt auf, dass die Modelle bei der $\Phi - \Psi$ -Winkelverteilung ähnlich gut abschneiden wie die Kristallstrukturen der PDB-Datenbank. Bindungslängen und -winkel, die bei den Kristallstrukturen aufwändig optimiert werden, zeigen bei den Modellen größere Abweichungen, die zurückzuführen sind auf die relativ kurzen Minimierungen (100 Schritte Steepest-Descent-Minimierung), die sich an die Dynamiken angeschlossen haben. Die schlechtesten Einzelresultate bei den Modellen ergab die Kontrolle der Planarität der Amidbindungen (ω -Winkel). Hier zeigt sich eine Schwäche der Berechnung der Strukturen mit Kraftfeld-Methoden, die zu starke Abweichungen von den Standardwerten zulassen. Oft sind Stellen, an denen solche Abweichungen entstehen, die Anknüpfungsstellen von eingefügten Loops. Daher sind die Modelle von CYP2A5 und CYP2C5 auch noch etwas schlechter als das OXA-Modell, dem keine Loops hinzugefügt werden mussten.

Die Gesamtstruktur des CYP2A5-Modells weist nach wesentlich längerer Simulationszeit eine zu den dynamisch gerechneten Kristallstrukturen vergleichbare Qualität auf. Die verwendeten Kraftfeldmethoden sind demnach in der Lage ein Modellprotein bezüglich seiner Geometrie auch über längere Zeitspannen korrekt darzustellen.

Tabelle 6.5: Auflistung der Bewertungsparameter des Programms PROCHECK für die untersuchten Kristallstrukturen (PDB-Datenbank) und Modelle (minimierte Endstrukturen der Dynamiken in GROMACS). Die als G-Faktor ausgedrückten Bewertungsparameter sollten idealerweise über -0,5 liegen, bei Werten, die kleiner als -1 sind, sollte die Struktur gründlich überprüft werden.

Parameter	OXA		CYP2C5		CYP2A5
	Kristall	Modell	Kristall	Modell	Modell
Bindungslänge	0,66	0,36	0,63	0,37	0,37
Bindungswinkel	0,48	-0,04	0,21	-0,08	-0,06
$\Phi - \Psi$ -Winkelverteilung	-0,33	-0,23	-0,90	-0,44	-0,45
$\chi_1 - \chi_2$ -Winkelverteilung	-0,15	-0,28	-0,76	-0,27	-0,37
ω -Winkel	0,48	-0,74	0,54	-0,82	-0,82
Gesamtwertung	0,35	-0,15	0,01	-0,20	-0,20

6.6.4 Sekundärstrukturen

Wie schon mehrfach erwähnt, spielt die konservierte dreidimensionale Faltung der Cytochrome eine wichtige Rolle für ihre Funktion. Daher wurden die berechneten Modelle mit Hilfe von PROCHECK_COMP mit ihrer Ausgangsstruktur verglichen, um festzustellen, ob die konservierten Sekundärstrukturen erhalten geblieben sind. Abbildung 6.15 zeigt den Vergleich der CYP2C5-Kristallstruktur mit der Endstruktur der Dynamik nach dem Modellbau.

Es ist deutlich zu erkennen, dass alle in der Kristallstruktur vorhandenen Sekundärstrukturen auch nach 600 ps Dynamik (200 ps freie Dynamik) noch erhalten geblieben sind. Einige Helices haben sich stabilisiert und sind im Lauf der Dynamik länger geworden. Das Beta-Faltblatt 2 (Stränge 2-1 und 2-2), das in der Kristallstruktur zwar optisch in Form von parallel laufenden Strängen ausgemacht werden kann, aber nicht exakt über die nötigen Geometrien verfügt, wird in der minimierten Struktur der Dynamik eindeutig identifiziert.

Die Methode der Moleküldynamik-Simulation ist also in der Lage das Verhalten eines Proteins in einer Wasserbox zu simulieren, ohne weitere Rückhaltekräfte zu verwenden. Das Dynamikmodell von CYP2A5 sollte daher ein gutes Bild der Realität wiedergeben. Die existierenden Unterschiede zu den Kristallstrukturen sind bedingt durch die Unterschiede in der Umgebung der Proteine (dichte Kristallpackung im Gegensatz zum Protein in Lösung).

6.6.5 Konservierte Salzbrücken

In Kapitel 6.1.2 wurden mehrere wichtige Motive für CYPs beschrieben, darunter auch Salzbrücken zwischen konservierten Strukturen. Nach der Dynamik wurden diese Motive untersucht und mit der Ausgangsstruktur verglichen.

Häm-Bindung Das Häm wird neben der Bindung durch das Cystein der Cystein-Bindungstasche (Cys399 bei CYP2A5) noch durch mehrere konservierte basische Aminosäuren fixiert, die mit den Propionat-Seitenketten des Häms wechselwirken. In der Anfangsstruktur von CYP2A5 vor den Dynamiken war das Häm an Arg372, Arg437 und Ser433 über Salz- oder Wasserstoffbrücken ge-

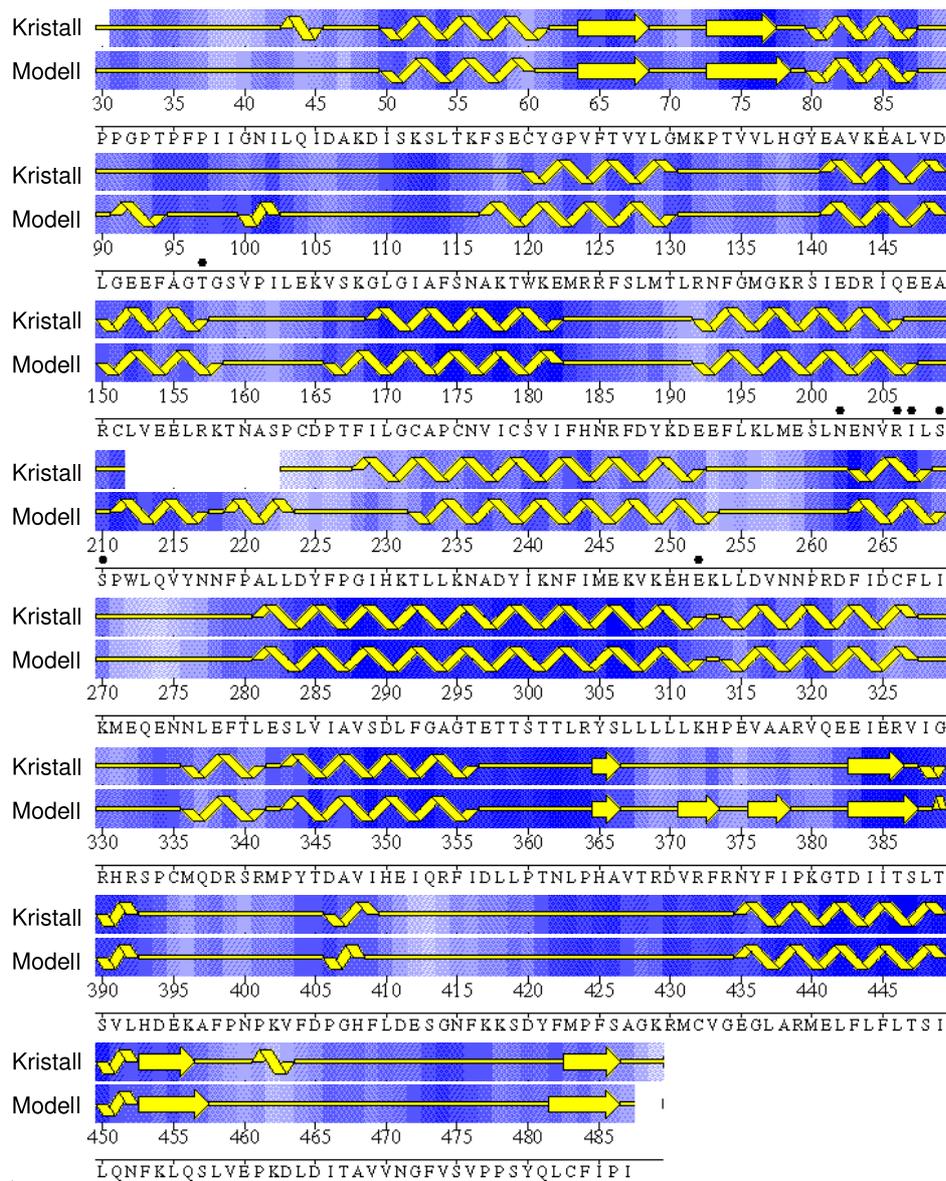


Abbildung 6.15: Vergleich der Sekundärstrukturelemente der CYP2C5-Kristallstruktur und der minimierten Endstruktur der Dynamik des ergänzten 2C5-Modells. Die Schlangenlinien deuten Helices an, die Pfeile entsprechen Beta-Faltblattstrukturen. Die Lücke von AS 212 - 222 in der Sekundärstruktur des 2C5-Kristalls entspricht dem kristallographisch nicht erfassten F-G-Loop, der in das Modell eingebaut wurde (vgl. Kap. 6.4.2). Mit der Hintergrundintensität wird ein Maß für die Lage der Aminosäuren im Protein gegeben (dunkel = außen; hell = innen).

bunden. Auch Arg128 liegt in der Nähe eines der beiden Propionate und kann dort über eine Salzbrücke mit einer Propionat-Seitenkette interagieren. Diese Interaktion ist auch experimentell bestätigt worden, denn bei einer natürlich vorkommenden Mutante mit Austausch des basischen Arginin 128 gegen Glutamin ist die Häm-Inkorporation in das Enzym gestört [90].

Nach der Dynamik waren alle ionischen Wechselwirkungen weiterhin vorhanden, wobei besonders Arg128 während der Dynamik eine stabile Salzbrücke zu einem der Propionate hält. Ser433 verlor seinen direkten Kontakt zum Häm, ist jedoch über ein Wassermolekül weiterhin mit dem Propionat verbunden. Allerdings zwingt das in die H-Brücke gewanderte Wassermolekül die Seitenkette von Ser433 aus ihrer Position und bewirkt eine Verschiebung der Φ - und Ψ -Winkel der Serine in einen energetisch ungünstigen Bereich (s. Kap. 6.6.3).

G-H-Helix Zwischen G- und H-Helix besteht bei den prokaryotischen CYPs eine konservierte Salzbrücke. Diese Salzbrücke wird in der CYP2C5-Kristallstruktur durch ein Histidin und ein Asparagin ausgebildet und blieb während der gesamten Dynamik von CYP2C5 erhalten. Das basische Histidin ist bei den Cytochromen der 2A-Unterfamilie durch ein ungeladenes Asparagin (Asn255) ersetzt, das keine ionischen Wechselwirkungen eingehen kann. Um die starke Wechselwirkung dieser Salzbrücke zu ersetzen bildet dieses Asparagin während der gesamten Dynamik zwei Wasserstoffbrücken-Bindungen mit zwei konservierten Aspartaten der H-Helix aus (Asp266 und Asp269). Durch diesen Ersatz bleibt die Lage der Helices zueinander auch ohne Salzbrücke erhalten.

ER/R-Motiv Dieses bei den ersten bakteriellen Kristallstrukturen gefundene Motiv wird bei den Cytochromen der Familie 2 in leicht veränderter Form wiedergefunden (ER/H). Das zweite Arginin ist durch Histidin ersetzt (His415 bei CYP2A5). Es liegt weiterhin nahe bei Glutamat 358, beteiligt sich aber nicht mehr an der Salzbrücke. Die einzigartige räumliche Struktur des Mäander-Bereiches bleibt trotzdem erhalten.

6.6.6 Koordination am Eisen

Im Ruhezustand des Enzyms ist die sechste Bindungsstelle am Häm-Eisen mit einem Wassermolekül besetzt (vgl. Kap. 2.5). Auch bei den durchgeführten Dynamiken wurde stets ein Wassermolekül in dieser Position gefunden, das damit die experimentellen Resultate bestätigt (s. Abb. 6.16).

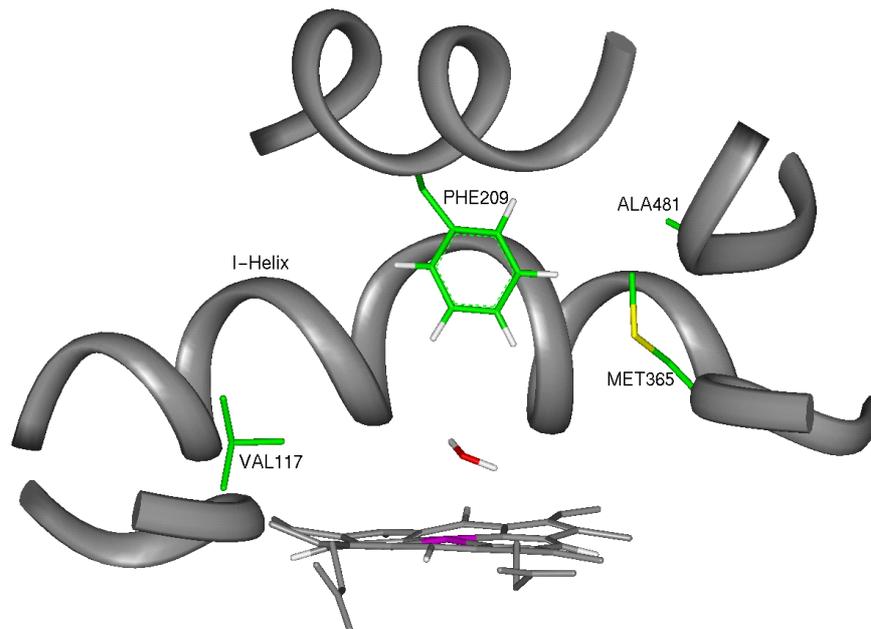


Abbildung 6.16: Aktives Zentrum von CYP2A5 nach 1400 ps freier Dynamik. Oberhalb des Häms ist ein Wassermolekül als sechster Ligand gebunden. (Von den dargestellten Aminosäuren sind nur die Seitenketten und C α -Atome abgebildet)

6.7 Einbau von Substraten

Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über die für die Einbringung der Substrate in das aktive Zentrum gewählte Vorgehensweise. Die Durchführung von Dynamiken mit Substraten diente der Validierung des Modells. Die Proteinmodelle sollten in der Lage sein, Erklärungen für die unterschiedlichen Umsetzungsraten der verschiedenen Substanzen zu liefern. Zu diesem Zweck wurden mehrere Mutanten von CYP2A5 im

Computer aufgebaut, die verschiedene Substrate unterschiedlich gut umsetzen. Die Modelle reproduzieren dabei die experimentell gefundenen Umsetzungsraten.

6.7.1 Auswahl einer geeigneten Proteinstruktur

Vor der Durchführung der Dynamiken mit Substrat musste eine Proteinkonformation (Frame³²) ausgewählt werden, die als repräsentatives Beispiel für die dynamische Struktur dient. In dieses Molekül wurde dann das Substrat eingebracht und das resultierende Gesamtsystem dynamisch gerechnet. Um einen passenden Frame auszuwählen existieren zwei Vorgehensweisen. Eine Möglichkeit besteht darin, eine Durchschnittsstruktur über einen Zeitausschnitt der Dynamik zu bilden. Damit verbunden ist eine Mittelung eventueller in dieser Zeitspanne ablaufender Bewegungen einzelner Proteinteile oder Aminosäureseitenketten³³. Durchschnittsstrukturen dieser Art müssen im Anschluss noch minimiert werden, um verzerrte Bindungslängen und Winkel zu bereinigen. Eine zweite Vorgehensweise besteht in der Auswahl mehrerer Frames nach vorgegebenem Muster (z. B. jeder zehnte Frame über 100 ps). Nach Bewertung der Güte dieser Strukturen kann dann mit einer ausgewählten Struktur direkt weitergearbeitet werden, ohne auf Probleme aus der Mittelung von Bewegungen Rücksicht nehmen zu nehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die zweite Methode benutzt, um mit "echten" Frames zu arbeiten. Aus den letzten 100 ps der freien Dynamik des CYP2A5-Modells wurde jeder zehnte archivierte Frame (10 ps) extrahiert und einer identischen Energieminimierung unterzogen (100 Schritte; Steepest-Descent-Minimierung). Diese Minimierung war nötig, weil durch die dynamischen Bedingungen Teile der Struktur (Bindungslängen, -winkel, planare Strukturen wie Phenylringe etc.) gestreckt, gestaucht oder verbogen werden. Die Bewertung der Güte einer Struktur erfolgt aber anhand von Parametern, die aus Kristallstrukturen gewonnen wurden und insofern idealisiert

³²"Schnapsschuss" aus der Dynamik, der vom Programm GROMACS nach 1000 Rechenschritten (1000 fs = 1 ps) ausgegeben und archiviert worden ist.

³³Bewegt sich zum Beispiel eine Seitenkette im ausgewählten Zeitraum von Position A nach B (zwei für diese Seitenkette erlaubte Konformationen), so befindet sie sich in einer Durchschnittsstruktur auf halbem Weg zwischen den beiden erlaubten Zuständen. Damit ist sie in der Durchschnittsstruktur in einer energetisch ungünstigen und daher unwahrscheinlichen Position eingefroren. Auch die Position von Wasseratomen ist mit Hilfe einer Durchschnittsstruktur nur schlecht wiederzugeben.

sind. Durch die kurze Minimierung werden die größten Ungenauigkeiten beseitigt und eine Vergleichbarkeit der Daten ermöglicht.

Die erhaltenen minimierten Frames wurden mittels PROCHECK auf ihre Güte untersucht und desweiteren visuell kontrolliert. Dabei wurden besonders das aktive Zentrum und die Bewegungen der umgebenden Aminosäuren betrachtet. Tabelle 6.6 fasst die Ergebnisse der PROCHECK-Untersuchungen zusammen.

Tabelle 6.6: Ergebnisse der PROCHECK-Untersuchungen an 11 Frames aus den letzten 100 ps der freien Dynamik von CYP2A5 (Wildtyp)

Frame	Anteil Aminosäuren in den Bereichen (in %)				ungünstige Kontakte	gesamt G-Faktor
	favorisiert	günstig	weniger günstig	ungünstig		
1800 ps	81,8	15,2	2,0	1,0	0	-0,18
1810 ps	80,8	17,2	1,5	1,2	0	-0,19
1820 ps	80,2	17,5	1,0	1,2	0	-0,18
1830 ps	78,2	18,8	1,2	1,8	0	-0,19
1840 ps	78,2	19,2	0,8	1,8	0	-0,19
1850 ps	80,5	17,2	0,8	1,5	1	-0,17
1860 ps	80,2	17,5	1,0	1,2	2	-0,16
1870 ps	77,8	19,8	0,8	1,8	0	-0,21
1880 ps	78,2	18,8	1,0	2,0	0	-0,21
1890 ps	78,8	18,5	0,8	2,0	0	-0,21
1900 ps	80,2	16,0	1,5	1,5	0	-0,20

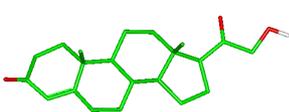
Die Analyse der Ergebnisse macht deutlich, dass alle Strukturen mit ihren G-Faktoren deutlich oberhalb des für gute Strukturen angegebenen Minimalwerts von -0,5 lagen. Die Auswertung der Backbone-Winkel (Ramachandran-Plot) und der vorhandenen Sekundärstrukturelemente zeigte, dass die nach 1800 ps erhaltene Struktur die günstigste war. Hier sind alle Sekundärstrukturelemente von Cytochromen P450 vorhanden (insbesondere sind auch alle Faltblätter erkennbar) und die Winkelauswertung weist die geringste Anzahl an Aminosäuren in "nicht erlaubten" Regionen auf (siehe auch Kap. 6.6.3). Auch die visuelle Betrachtung der Strukturen zeigte keine ungewöhnlichen Konformationen auf. Die Daten zeigen, dass alle Momentaufnahmen qualitativ vergleichbar sind und sich das Molekül in der Dynamik stabil verhält. An sich könnte jeder dieser Konfigurationen sollte als repräsentative Struktur dienen. Für die folgenden Docking-Untersuchungen und weitere Dynamiken wurde die 1800 ps-

Struktur verwendet, weil sie die geringste Anzahl an Aminosäuren im ungünstigen Bereich aufwies.

6.7.2 Auswahl der Substrate

Im Anschluss wurde das entstandene CYP2A5-Modell auf seine Aussagekraft überprüft. Zur Überprüfung wurden experimentelle Resultate mit Hilfe von Moleküldynamik-Simulationen erklärt. Bei der Auswahl geeigneter experimenteller Ergebnisse fiel auf, dass mit der Mutation einer Aminosäure (Phe209) eine Vergrößerung des aktiven Zentrums einherzugehen scheint. Dies kann aus der Umsetzung verschiedener Steroide geschlossen werden [70, 142, 143]. Ein gut geeignetes Unterscheidungsmerkmal der Mutanten liegt in den experimentellen Ergebnissen zur Corticosteron-Umsetzung (s. Tab. 6.7). Während der Wildtyp von CYP2A5 nur in der Lage ist Deoxycorticosteron umzusetzen, können die Mutanten auch das um eine Hydroxyl-Gruppe größere Corticosteron umsetzen. Die Autoren schließen daraus, dass die Mutation des voluminösen Phenylalanins im Wildtyps gegen die kleineren Aminosäuren Asparagin oder Leucin das aktive Zentrum soweit vergrößert, dass auch Corticosteron umgesetzt werden kann. Die Erklärung dieser Zusammenhänge sollte die Aussagekraft des Modells testen.

Tabelle 6.7: Umsetzungsgeschwindigkeiten von Deoxycorticosteron und Corticosteron in verschiedenen CYP2A5-Mutanten. (grün = Kohlenstoff, rot = Sauerstoff, weiß = Wasserstoff; alle an Kohlenstoff gebundenen Wasserstoff-Atome sind nicht dargestellt)

	Umsetzungsrate in $nmol / (min \cdot nmol \text{ (Enzym)})$	
		
	Deoxycorticosteron	Corticosteron
Wildtyp	0,1	n.d. ^a
F209N	8	16
F209L	16	n.d. ^a

^a keine messbare Umsetzung (not detectable)

6.7.3 Positionierung der Substrate

Das Einpassen der Substrate in das aktive Zentrum der Enzyme wurde per Hand vorgenommen. Wichtige Leitlinien für die optimale Positionierung wurden aus den Kristallstrukturen gewonnen, bei denen ein Substrat mitkristallisiert worden war (P450_{cam}; P450_{OXA}).

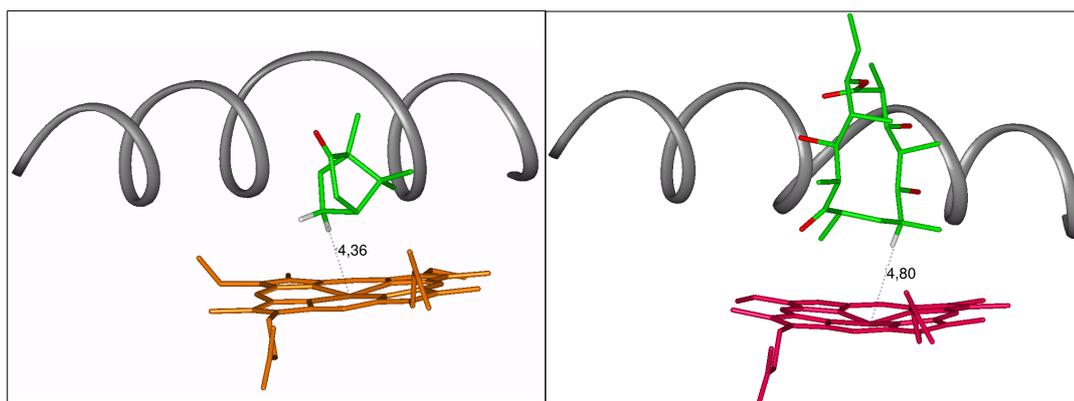


Abbildung 6.17: Abstand (in Å) der Umsetzungsposition der Substrate vom Häm-Eisen bei den Kristallstrukturen von P450_{cam} (links) mit Campher und P450_{OXA} (rechts) mit Erythronolid B. Im Hintergrund in grau dargestellt ist das Proteinrückgrat der I-Helix. Bei den Substraten sind nur die Wasserstoffe des zu hydroxylierenden Kohlenstoff-Atoms abgebildet.

Abbildung 6.17 zeigt die aktiven Zentren der beiden Kristallstrukturen. Der Abstand der Kohlenstoffatome, die bei der Hydroxylierungsreaktion umgesetzt werden, zum Häm-Eisen beträgt 4,36 Å bei P450_{cam} bzw. 4,80 Å bei P450_{OXA}. Ein Abstand von 4 - 5 Å ist also nötig, um eine Umsetzung zu ermöglichen. Wird der Abstand zu groß, ist ein Angriff des über dem Eisen gebundenen Sauerstoffs nicht möglich. Ist der Abstand zu gering, ist nicht genug Raum vorhanden, um den Sauerstoff über dem Eisen zu fixieren. In beiden Fällen findet keine Umsetzung statt. Desweiteren ist in Abbildung 6.17 zu erkennen, dass die C-H-Bindung, in die während der Umsetzung das Sauerstoff-Atom eingeführt wird, in Richtung des Häm-Eisens steht. Diese Ausrichtung ist eine weitere Voraussetzung für eine erfolgreiche Umsetzung.

Bei den CYP2A5-Mutanten werden sowohl Corticosteron als auch Deoxycorticosteron in Position 15 α hydroxyliert. Um das Verhalten der Substrate während der

Dynamiken vergleichen zu können, wurden alle Substrate, analog der oben erwähnten Voraussetzungen für eine erfolgreiche Umsetzung, so optimal wie möglich in das aktive Zentrum der jeweiligen Enzyme eingesetzt. Das C₁₅-Atom des Steroids war in allen Startgeometrien das Kohlenstoffatom mit dem geringsten Abstand zum Häm-Eisen. Das Wasserstoffatom in Position C₁₅α des Steroids war zum Häm-Eisen hin ausgerichtet.

Zusätzlich zu diesen geometrischen Kriterien wurde auch die elektronische Umgebung im aktiven Zentrum mit dem Programm GRID untersucht [124] (s. Kap. 5.5). Die dabei erhaltenen Felder sind in Abbildung 6.18 für das CYP2A5-Modell (Wildtyp) dargestellt.

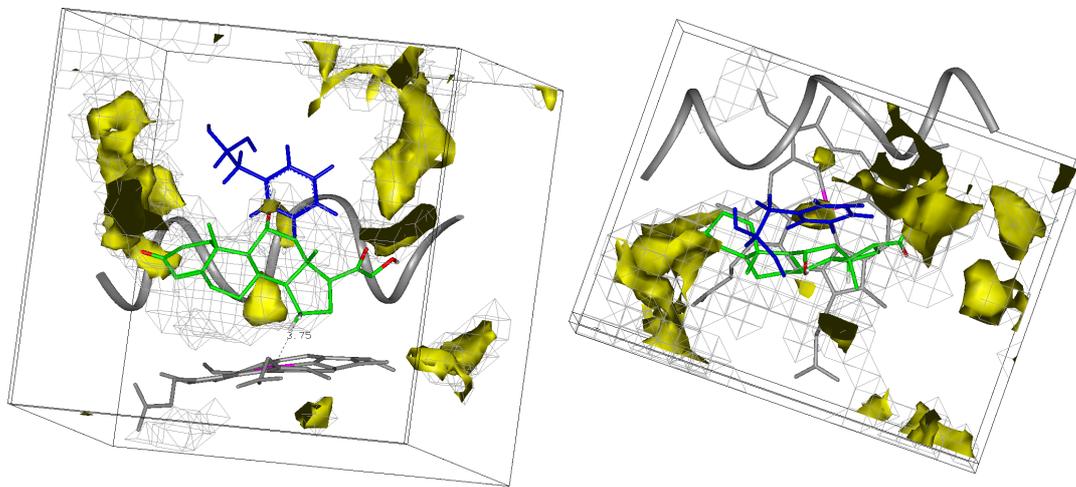


Abbildung 6.18: GRID-Felder für das aktive Zentrum des CYP2A5-Modells, in die Corticosteron eingesetzt wurde. Die schwarze Box zeigt die Grenzen der GRID-Berechnungen an. Dargestellt sind das Proteinrückgrat der I-Helix, das Häm (grau, Eisen in magenta), sowie Phe209 (blau). Corticosteron ist nach Atom-Typen eingefärbt, die Wasserstoff-Atome bis auf die an C₁₅ ausgeblendet. Das graue Gitter wurde mit der C3-Sonde erhalten und gibt das freie Volumen im aktiven Zentrum wieder. Gelbe Felder wurden mit der Wasser-Sonde (OH₂) erhalten. Sowohl die Carbonyl-Funktion an C₃, als auch die Hydroxyl-Gruppe an C₁₁ haben Kontakt mit einem Feld der Wasser-Sonde und können günstige Wechselwirkungen mit dem Protein eingehen. Links: Ansicht parallel zum Häm; rechts: Drehung um 90° nach vorne zur Aufsicht auf das Häm.

Sowohl die Carbonyl-Funktion an C_3 als auch die Hydroxyl-Gruppe an C_{11} haben Kontakt mit einem Feld der Wasser-Probe und können dort günstige Wechselwirkungen mit dem Protein ausbilden. Der Abstand von C_{15} zum Häm-Eisen ist mit $3,75 \text{ \AA}$ etwas kurz, ergab sich aber aus der Größe des aktiven Zentrums in diesem Bereich. Die Seitenkette an C_{17} des Corticosterons ragt in einen Bereich, der noch kein freies Volumen aufweist. In dieser Region liegen jedoch nur Aminosäure-Seitenketten, die beweglich sind und durch leichte Veränderung ihrer Konformation schon nach den ersten Schritten der folgenden Dynamiken Raum für das Substrat zur Verfügung gestellt haben.

Da das aktive Zentrum, wie alle anderen Hohlräume im Enzym, mit Wasser gefüllt ist, mussten beim Docken der Substrate ins aktive Zentrum dort gelegene Wassermoleküle entfernt werden. Die Auswahl der Wassermoleküle wurde mit Hilfe eines Abstandskriteriums vorgenommen. Alle Wassermoleküle, deren Atome näher an Substrat-Atomen lagen als die Summe ihrer van-der-Waals-Radien, wurden aus dem aktiven Zentrum entfernt. Nun wurde erneut kurz minimiert (100 Schritte Steepest-Descent-Minimierung), um eventuelle ungünstige Atomkontakte vor Beginn der Dynamiken zu reduzieren.

6.7.4 Dynamik und Ergebnisse

Im Folgenden wurden Moleküldynamiksimulationen durchgeführt, die das unterschiedliche Verhalten der Substrate erklären sollten. Weil beim Einbau der Substrate in das aktive Zentrum Wassermoleküle entfernt wurden, diente die erste Dynamik von 40 ps Länge der Neuausrichtung aller Wassermoleküle. Die Atome des Proteins und des Substrats blieben während dieser 40 ps mit hoher Kraft auf ihren Ausgangspositionen fixiert. Es folgte eine weitere kurze Dynamik (10 ps), in der nur noch das Proteinerückgrat, das Häm und zwei Atome des Substrats (C_7 und C_{15}) mit Rückstellkräften belegt waren. Es sollte hier den Seitenketten, insbesondere denen des aktiven Zentrums, die Gelegenheit gegeben werden sich an die veränderte Umgebung anzupassen, ohne zu große Verzerrungen auszulösen. Erst nach diesen 50 ps mit Rückhaltekräften schloss sich eine freie Dynamik über 300 ps an.

Die Ergebnisse dieser ersten Dynamiken waren unbefriedigend, weil kein Unterschied festgestellt werden konnte zwischen dem Verhalten von Corticosteron und Deoxycorticosteron im aktiven Zentrum von CYP2A5. Beide Substanzen bewegten sich in vergleichbarer Weise und nehmen eine Position oberhalb des Häm ein. Abbildung 6.19 zeigt dieses Verhalten am Beispiel von Corticosteron. Neben der Verkleinerung des C₁₅-FE-Abstands geht vor allem die Ausrichtung der C-H-Bindung, in die das Sauerstoff-Atom eingefügt werden soll, in Richtung Häm-Eisen verloren. Identische Ergebnisse wurden mit Deoxycorticosteron bei dieser und anderen Mutanten erhalten

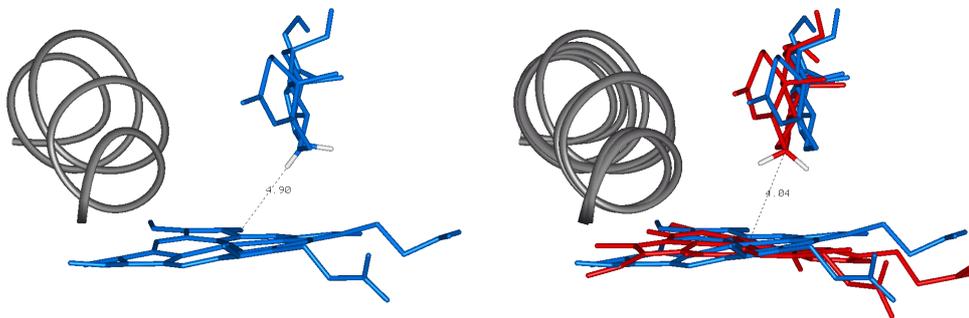


Abbildung 6.19: Position von Corticosteron im aktiven Zentrum von CYP2A5 vor der Dynamik (links) und nach der Dynamik im Vergleich mit der Startstruktur (rechts).

Die Position oberhalb des Häm-Eisens ist im Lauf der Hydroxylierungsreaktion mal von einem Sauerstoff-Molekül und mal von einem Sauerstoff-Atom besetzt. Dynamiken ohne Berücksichtigung des Sauerstoffs sind daher nicht in der Lage, die Unterschiede der Umsetzungsraten zu erklären, weil die räumlichen Gegebenheiten im aktiven Zentrum nicht dem Zustand bei der Umsetzung entsprechen. Ohne den Sauerstoff, der essentieller Teil der Hydroxylierung ist, kann die Positionierung der Substrate Corticosteron und Deoxycorticosteron nicht unterschieden werden.

6.8 Sauerstoff im aktiven Zentrum (Wildtyp)

Um die Realitätsnähe des Modells zu vergrößern, wurde im nächsten Schritt ein Zustand des Enzyms betrachtet, der auch ein Sauerstoff-Molekül im aktiven Zentrum berücksichtigt.

6.8.1 Röntgenstruktur von CAM mit Sauerstoff

Im Jahr 2000 klärten Schlichting und Mitarbeiter verschiedene Übergangszustände von P450_{cam} mit Hilfe der Röntgenkristallographie auf [21]. Es gelang ihnen die Darstellung des Enzyms mit gebundenem Substrat und einem Sauerstoffmolekül bzw. einem Sauerstoff-Atom oberhalb des Häm-Eisens. Für das weitere Vorgehen in dieser Arbeit wurde die Struktur mit dem Sauerstoff-Molekül genutzt. Sie liegt als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Umsetzung relativ lange vor und die elektronischen Verhältnisse am Häm und seiner Umgebung sind noch nachvollziehbar. Die weitere durch diese Arbeitsgruppe aufgeklärte Struktur mit Sauerstoff-Atom stellt die eigentliche reaktive Sauerstoff-Spezies dar und ist bezüglich ihrer Ladungsverteilung nicht eindeutig (Schritt 7 in Abb. 2.4).

Bei der verwendeten Struktur ist ein Atom (O1) des Sauerstoff-Moleküls in einem Abstand von 1,81 Å senkrecht über dem Häm-Eisen angeordnet. Das zu hydroxylierende Kohlenstoff-Atom des Substrates Campher liegt in 4,36 Å Entfernung vom Häm-Eisen und die betroffene CH-Bindung ist nicht direkt auf das Häm-Eisen gerichtet, sondern zeigt auf einen Punkt zwischen Häm-Eisen und Sauerstoff-Molekül (vgl. Abb. 6.20 links). Die Ausschnittsvergrößerung (Abb. 6.20 rechts) macht die Enge im aktiven Zentrum deutlich. Bei raumerfüllender Darstellung des Sauerstoffs und der zu hydroxylierenden C-H-Bindung überlappen die Atomradii von Sauerstoff und Wasserstoff. Bei der Umsetzung müssen demnach die beiden Atome (O1 und H1) dann "nur noch" ihre Position tauschen.

Desweiteren ist bei dieser Struktur in der Aufweitung der I-Helix in unmittelbarer Nähe zum Sauerstoff-Molekül ein Wasser-Molekül gebunden, das als letztes Glied in einer Kette von Wasser-Molekülen Protonen aus dem Solvens bis ins aktive Zentrum transportiert. Diese Protonen sind ein unverzichtbarer Teil des katalytischen Mecha-

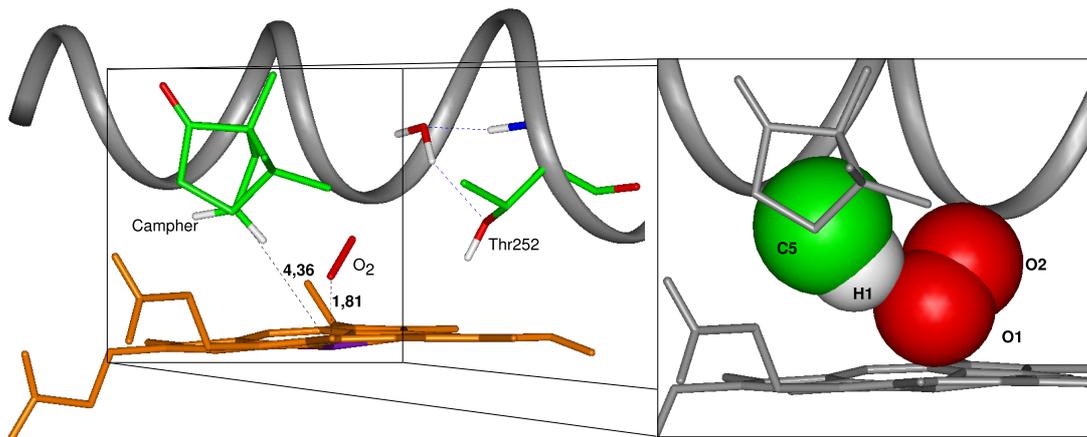


Abbildung 6.20: Darstellung des aktiven Zentrums von CYP101 (P450_{cam}) nach der von Schlichting et al. veröffentlichten Kristallstruktur [21, PDB-Code: 1DZ8]. Links: dargestellt sind das Häm (orange, Eisen in magenta), ein gebundenes Sauerstoff-Molekül (O₂), das Substrat Campher, ein Ausschnitt des Proteinrückgrats der I-Helix (grau) und ein in der I-Helix durch Thr252 gebundenes Wasser-Molekül. Die Abstände vom Häm-Eisen zum Sauerstoff-Molekül und zur Hydroxylierungsstelle im Substrat betragen 1,81 bzw. 4,36 Å. Rechts: Ausschnittsvergrößerung von links (Kasten). Wichtige Atome sind als Kalottenmodell farbig dargestellt. Alle anderen Atome des Camphers und des Häm sind grau.

nismus (siehe auch Kap. 2.5). Der Abstand des Sauerstoff-Atoms O1 zum Sauerstoff-Atom des Wassers in der I-Helix beträgt 4,75 Å.

6.8.2 CYP2A5 mit O2

Das für die enzymatische Umsetzung essentielle Wasser-Molekül in der I-Helix wurde auch in der Dynamik des Wildtyps von CYP2A5 gefunden. Schon nach kurzer Simulationszeit wandert ein Wassermolekül in die I-Helix und bleibt für den gesamten Verlauf der Dynamik dort gebunden. Als Bindungspartner dienen die über fast alle Cytochrome P450 konservierten Aminosäuren Alanin und Threonin in der Mitte der I-Helix (Ala301 und Thr305 bei CYP2A5). In allen im weiteren Verlauf der Arbeit gebauten Modellen wurde ebenfalls ein Wasser-Molekül in vergleichbarer Position in der I-Helix gefunden. Abbildung 6.21 zeigt die Position des Wasser-Moleküls und

die ausgebildeten Wasserstoffbrücken-Bindungen am Beispiel des CYP2A5-Wildtyp-Modells.

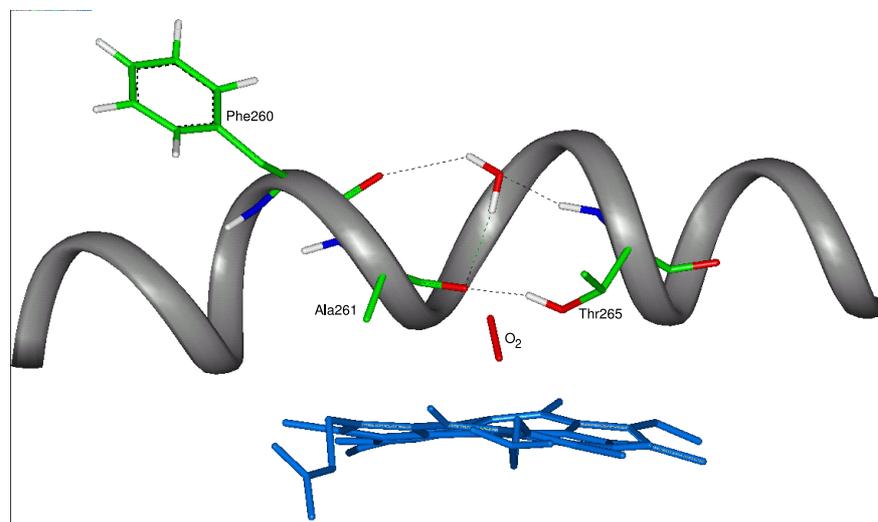


Abbildung 6.21: Aktives Zentrum des zum Docking der Substrate ausgewählten Frame der Dynamik von CYP2A5 (Wildtyp). Neben dem Proteinrückgrat der I-Helix (grau) und dem Häm (blau) ist das in der I-Helix gebundene essentielle Wasser-Molekül mit seinen Wasserstoffbrücken-Bindungen zu Aminosäuren der I-Helix dargestellt. In das Modell wurde ein Sauerstoff-Molekül (O_2), analog der Kristallstruktur von CYP101 (Abb. 6.20), eingefügt.

Um die Verhältnisse im aktiven Zentrum des CYP2A5-Modells realistischer zu gestalten, wurde in den für das Einpassen der Substrate ausgewählten Frame aus den letzten 100 ps der CYP2A5-Dynamik ein Sauerstoff-Molekül, analog der Positionierung im Kristall von P450_{cam} (CYP101), eingefügt. Der Sauerstoff wurde mit einer kleinen Rückhaltekraft auf die Entfernung des O1-Atoms an das Häm-Eisen und, um seine senkrechte Position über dem Häm zu halten, an die vier Pyrrolstickstoffe gebunden. Für weiter Informationen zur Fixierung des Sauerstoffs siehe Kapitel 5.2.

In die so veränderte Struktur wurden, analog dem Vorgehen in Kapitel 6.7.3, Corticosteron und Deoxycorticosteron in das aktive Zentrum einpasst. Die erhaltenen Strukturen wurden energieminiert und dann Dynamiksimulationen unterzogen.

6.8.3 Auswertung

Die Auswertung der Dynamiksimulationen lief bei allen Modellen gleich ab und wird hier exemplarisch beschrieben. Als Entscheidungskriterium dafür, ob eine Substanz im aktiven Zentrum umgesetzt werden kann, dienten die Kristallstrukturen von P450_{cam} und P450_{OXA}, in denen charakteristische Substrate mitkristallisiert wurden. Besonders wichtig war die P450_{cam}-Struktur mit gebundenem Sauerstoff [21], aus der Abstände und Winkel als Orientierungshilfe für die Auswertung übernommen wurden.

Als Voraussetzung für eine gute Umsetzung wurden folgende Punkte betrachtet:

1. Der Abstand zwischen zu hydroxylierendem Kohlenstoff-Atom und Häm-Eisen beträgt bei P450_{cam} und P450_{OXA} 4,36 bzw. 4,80 Å (s. Abb. 6.17). Solange der Abstand innerhalb eines Intervalls von etwa 4-5 Å bleibt, sollte eine Umsetzung des Substrats möglich sein. Bei zu kleinem Abstand ist die Inkorporation des Sauerstoff-Moleküls nicht möglich. Bei zu großen Entfernungen sind C-H-Bindung und Kohlenstoff-Atom so weit vom Eisen entfernt, dass eine Hydroxylierung ebenfalls nicht mehr möglich ist.
2. Zur Umsetzung der Substrate im aktiven Zentrum werden Protonen benötigt. Diese Protonen werden über eine Kette von Wassermolekülen aus dem Solvens ins aktive Zentrum geliefert. Das letzte Wassermolekül in dieser Kette ist nahe am Häm-Eisen gelegen und in der Aufweitung der I-Helix über Wasserstoffbrücken-Bindungen fixiert. Ohne ein Wassermolekül in dieser Position ist keine Umsetzung möglich.
3. In allen CYP-Kristallstrukturen, die mit Substrat kristallisiert worden sind, ist die C-H-Bindung, in die das Sauerstoff-Atom während der Hydroxylierung eingeführt wird, mit geringer Abweichung auf das Häm-Eisen hin ausgerichtet. Bei der Kristallstruktur mit gebundenem Sauerstoff ist diese Abweichung stärker geworden und zeigt eher auf die Verbindungsachse von Häm-Eisen und dem O1-Atom des gebundenen Sauerstoffs. Nach theoretischen Berechnungen zum Ablauf des entscheidenden Schritts der Hydroxylierung geht man davon aus, dass eine nahezu lineare Anordnung von Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff die günstigste Konstellation der drei Atome ist ($170^\circ < \angle CHO < 180^\circ$) [144, 145].

Um genauer zu charakterisieren, in welche Richtung die C-H-Bindung zeigt, wurden im Verlauf der Dynamik die Abweichungen von der idealen Ausrichtung ($\angle CHO = 180^\circ$) ausgemessen (s. Abb. 6.22). Winkel α gibt dabei die Auslenkung senkrecht zur Häm-Ebene an und der θ -Winkel beschreibt die Abweichung parallel zur Häm-Ebene. Das zur Auswertung der Dynamiken verwendete INSIGHT II-BCL-Skript ist im Anhang angefügt.

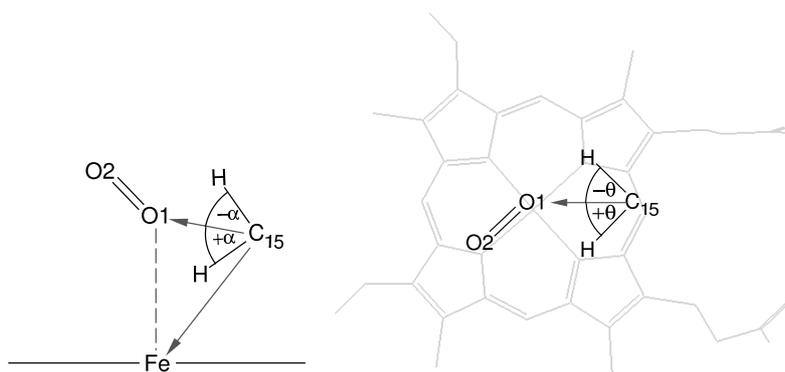


Abbildung 6.22: Auslenkung von der Idealgeometrie zur Umsetzung am Häm ($\alpha = \theta = 0^\circ$). Schematische Beschreibung der zur Auswertung der Dynamiken verwendeten Winkel. Angabe der Richtung durch positives oder negatives Vorzeichen.

6.8.4 Dynamik und Ergebnisse (Wildtyp)

Experimentelle Ergebnisse Der folgende Abschnitt soll kurz noch einmal die experimentellen Ergebnisse für das Enzym zusammenfassen. Beide untersuchten Substanzen sind schlechte Substrate des CYP2A5-Wildtyps. So ist eine Umsetzung von Corticosteron durch CYP2A5 nicht nachweisbar und die Umsetzungsrate von Deoxycorticosteron mit $0,1 \frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{nmol(P450)}}$ um den Faktor 160 kleiner als bei der später zu besprechenden F209L-Mutante (s. Kap. 6.10).

Wasser in der I-Helix Bei den Dynamiken des CYP2A5-Wildtyps mit Deoxycorticosteron und Corticosteron zeigte sich ein wichtiger Unterschied. Das Wassermolekül, das in der I-Helix gebunden ist und in der Dynamik mit Deoxycorticosteron an seiner Position verblieb, wurde in der Dynamik mit Corticosteron aus seiner Positi-

on verdrängt. Die Verdrängung dieses essentiellen Wassermoleküls erklärt, warum der Wildtyp nicht in der Lage ist Corticosteron zu hydroxylieren (s. Abb. 6.23). Ohne das

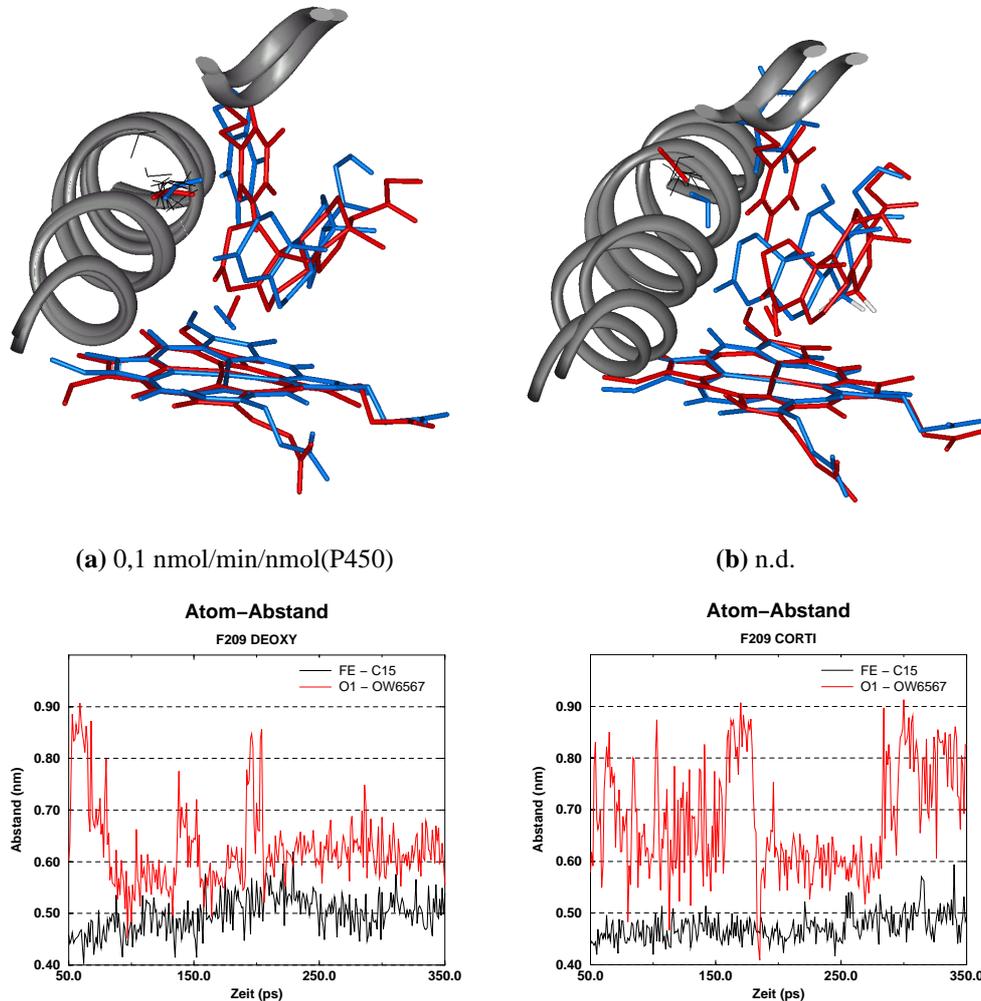


Abbildung 6.23: Die oberen Abbildungen zeigen einen Blick ins aktive Zentrum von CYP2A5 (Wildtyp) mit gebundenem Deoxycortico- (links) bzw. Corticosteron (rechts). Dargestellt sind jeweils die Startstruktur vor der Dynamik (blau) und die Endstruktur der Dynamik (rot), sowie in grau das Rückgrat der I-Helix, das zur Überlagerung der Strukturen benutzt wurde. Schwarz dargestellt sind die Positionen des Wassermoleküls, das in der I-Helix gebunden ist (angezeigte Frames: jede 20 ps aus den letzten 100 ps der Dynamik). Die jeweiligen Umsetzungsraten für die Substrate sind unter den Abbildungen angegeben [(a) + (b)]. Die Graphen zeigen den Abstand des C₁₅-Atoms zum Häm-Eisen (schwarz) und den Abstand des O₁-Sauerstoffs zum Sauerstoff-Atom des Wassers in der I-Helix (rot).

Wassermolekül in der I-Helix können keine Protonen ins aktive Zentrum geliefert werden. Damit ist der Hydroxylierungsmechanismus der Cytochrome P450 an entscheidender Stelle unterbrochen. Im Gegensatz dazu blieb das Wassermolekül während der Wildtyp-Dynamik mit Deoxycorticosteron nahezu durchgängig innerhalb der I-Helix gebunden.

Dynamiken mit Corticosteron und Deoxycorticosteron Bei beiden Dynamiken stieg der C₁₅-Eisen-Abstand an und kam mit Werten um 5 Å oder größer in einen Bereich, in dem eine Umsetzung unwahrscheinlich wird. Erschwerend für eine Umsetzung war ausserdem, dass die Ausrichtung der C-H-Bindung zum molekularen Sauerstoff verloren ging (s. Abb. 6.24).

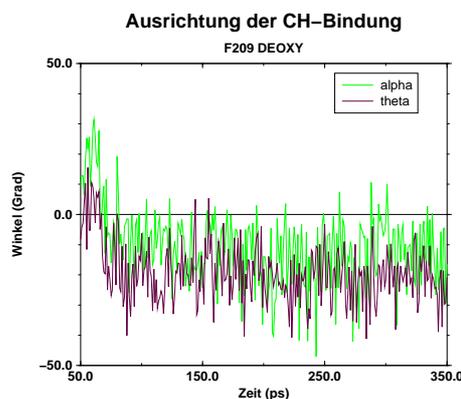


Abbildung 6.24: Ausrichtung der zu hydroxylierenden C-H-Bindung von Deoxycorticosteron im aktiven Zentrum von CYP2A5 (Wildtyp). Die Berechnung der Winkel wurde in Kap. 6.8.3 und Abb. 6.22 auf Seite 106 beschrieben. Der α -Winkel liegt im Schnitt bei -10° , der θ -Winkel bei -20° .

Die Abweichungen des Abstands und der Ausrichtung sind bei Deoxycorticosteron größer als bei Corticosteron. Grund hierfür ist die zusätzliche Hydroxyl-Gruppe des Corticosterons. Sie bildete während der Dynamik eine Wasserstoffbrücken-Bindung mit der in der F-Helix gelegenen Aminosäure Ser212 aus (s. Abb. 6.25). Diese Wasserstoffbrücke hielt das Corticosteron fast senkrecht zum Häm und drängte dadurch die voluminöse Seitenkette von Phe209 etwas zur Seite in Richtung I-Helix. Die Bewegung ist Grund für die Verdrängung des ansonsten in der I-Helix gebundene Wasser aus seiner relativ stabilen Position. Deoxycorticosteron kann diese Wasserstoffbrücke

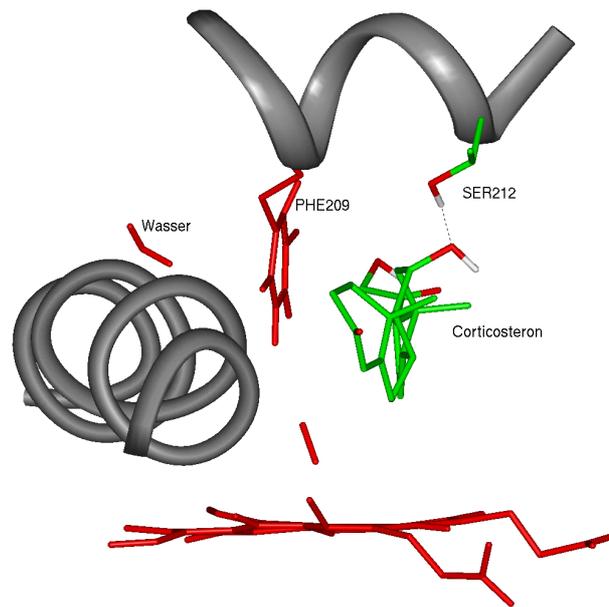


Abbildung 6.25: Abbildung des letzten Frames der Wildtyp-Dynamik mit Corticosteron. Ansicht parallel zur I-Helix (links). Das Wasser ist aus seiner Position in der Helix verdrängt. Eingezeichnet ist die ausgebildete Wasserstoff-Brücke vom Corticosteron zu Ser212

nicht ausbilden und wurde im Gegenteil von Phe209 stark aus seiner senkrechten Position über dem Häm herausgedrängt. Dies führte zur Abweichung des Alpha-Winkels in den negativen Bereich (d.h. die C-H-Bindung zeigt noch über den Sauerstoff hinaus; vgl. Abb. 6.22).

Diese Abweichungen sprechen nicht grundsätzlich gegen eine Hydroxylierung von Deoxycorticosteron. Die Reaktion kann aber nur stattfinden, wenn die verschiedenen Voraussetzungen gleichzeitig erfüllt sind. Dies ist selten der Fall und resultiert in einer geringen Umsetzungsrate.

6.9 Mutation F209N

6.9.1 Bau und Dynamik ohne Substrat

Der Bau der F209N-Mutante erfolgte ausgehend von der Wildtyp Struktur, die schon zum Docken der ersten Substrate ausgewählt wurde (s. Tab. 6.5). Dabei wurde die

Seitenkette von Phe209 gegen die Seitenkette eines Asparagins ausgetauscht. Die entstandene Mutante wurde zuerst energieminiert und anschließend einer Moleküldynamiksimulation unterzogen.

Die Dauer der Simulation wurde auf 700 ps beschränkt, da schon von einer äquilierten Struktur ausgegangen wurde (F209 mit 1800 ps freier Dynamik) und sich durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure nur die unmittelbare Umgebung dieser Aminosäure verändert und anpasst. Diese Anpassung war nach 600 ps abgeschlossen. Wie Abbildung 6.26 zeigt, ist die energetische Äquilibration schneller abgeschlossen (ca. 50 ps), doch erst nach 600 ps freier Dynamik weicht das Backbone der F209N-Mutante ähnlich weit von seiner minimierten Anfangsstruktur ab wie der Wildtyp (vgl. Abb. 6.12). Die RMSD-Abweichungen bleiben während der letzten 100 ps der Dynamik auf einem gleichbleibenden Niveau. Die letzten 100 ps dienen,

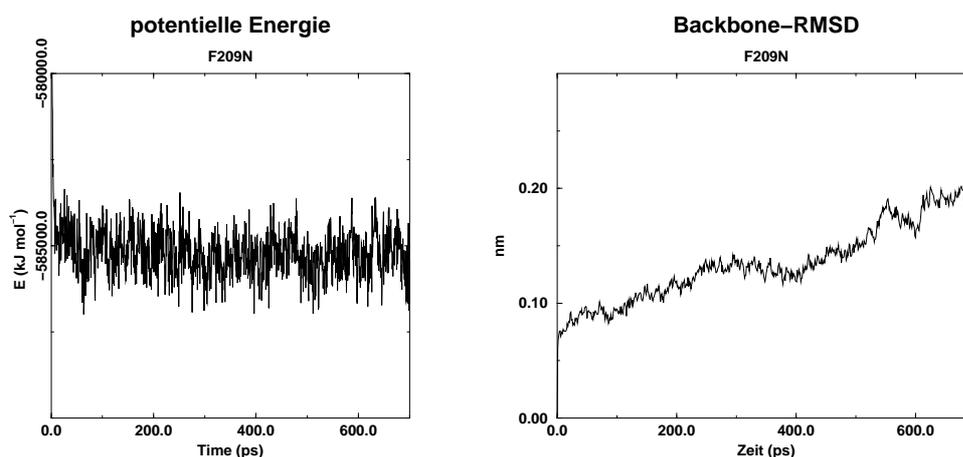


Abbildung 6.26: Verlauf der Potentialkurve (links) und des RMSD-Wertes für die Abweichungen des Proteinrückgrats (rechts) während der Dynamik der F209N-Mutante.

analog der Auswahl eines Frames aus der Wildtyp-Dynamik, der Untersuchung der Güte der Strukturen und der Auswahl einer günstigen Struktur für das Docking. Tabelle 6.8 zeigt die Ergebnisse dieser Auswertung, die zur Auswahl der Struktur nach 630 ps für die weiteren Rechnungen führte.

Tabelle 6.8: Ergebnisse der PROCHECK-Untersuchungen von 10 Frames aus den letzten 100 ps der freien Dynamik der F209N-Mutante

Frame	Anteil Aminosäuren in den Bereichen (in %)				ungünstige Kontakte	gesamt G-Faktor
	favorisiert	günstig	weniger günstig	ungünstig		
610 ps	79,5	18,2	0,8	1,5	2	-0,18
620 ps	80,8	17,0	0,5	1,8	2	-0,20
630 ps	79,2	18,2	1,2	1,2	0	-0,20
640 ps	78,8	18,0	1,0	2,2	0	-0,21
650 ps	80,2	16,8	1,2	1,8	0	-0,18
660 ps	80,0	17,0	1,2	1,8	0	-0,17
670 ps	81,2	16,2	0,8	1,8	1	-0,18
680 ps	80,5	16,5	1,5	1,5	2	-0,19
690 ps	79,2	17,2	2,0	1,5	1	-0,23
700 ps	80,0	17,2	1,2	1,5	1	-0,21

6.9.2 Dynamik und Ergebnisse (F209N)

Experimentelle Ergebnisse Die F209N-Mutante setzt sowohl Corticosteron als auch Deoxycorticosteron mit relativ hoher Geschwindigkeit um. Die Umsetzungsraten betragen dabei 16 bzw. $8 \frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{nmol}(\text{P450})}$. Die Mutation des Phenylalanins ermöglicht erst die Transformation von Steroiden. Dies wurde auch in anderen Studien zum Beispiel für Testosteron und Androstendion nachgewiesen [97, 101, 146, 147].

Wasser in der I-Helix Im Verlauf der Dynamiken mit den Substraten Corticosteron und Deoxycorticosteron konnte die mutierte Aminosäure Asparagin (N) in Position 209 eine stabile Wasserstoffbrücken-Bindung mit dem Wassermolekül ausbilden, das in der I-Helix gebunden ist. Diese Bindung stabilisiert zusätzlich zu den schon vorhandenen Wasserstoffbrücken-Bindungen die Positionierung des essentiellen Wassers in der I-Helix (s. Abb. 6.27). Es zeigt sich auch hier, dass die Aminosäure in Position 209 keinen direkten Einfluß auf das Substrat hat, sondern vor allem über die Positionierung des essentiellen Wassers mitentscheidet.

Dynamik mit Corticosteron Da Asparagin ein wesentlich kleineres Volumen einnimmt als Phenylalanin, wurden hier, im Gegensatz zum Wildtyp, keine Interaktionen von Asn209 mit Corticosteron bei der Bindung des Substrats im aktiven Zentrum be-

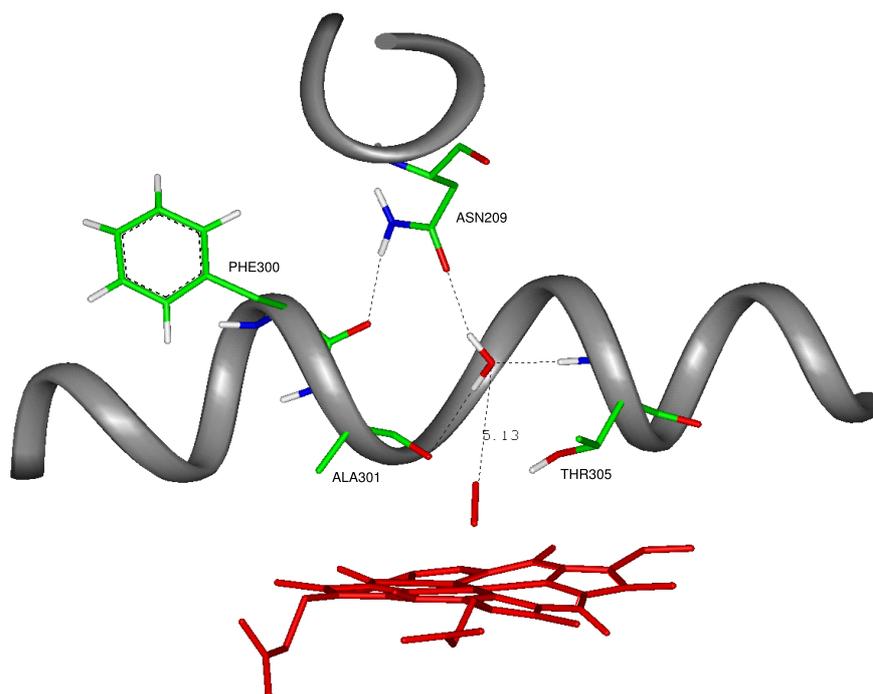


Abbildung 6.27: Wasserstoffbrücken-Muster in der Aufweitung der I-Helix (grau) der F209N-Mutante. Das essentielle Wasser ist gebunden an Ala301, Thr305 und Asn209.

obachtet. Ebenso wie in der Wildtyp-Mutante nahm Corticosteron wieder eine Position senkrecht zur Häm-Ebene ein und bildete eine Wasserstoff-Brücke zu Ser212 aus (vgl. Abb. 6.28).

Corticosteron konnte sich ohne das störende Volumen der Seitenkette von Phenylalanin 209 optimal ausrichten, und der Abstand des C_{15} -Atoms des Corticosterons zum Häm-Eisen blieb immer zwischen 4 - 5 Å. Das entspricht dem Bereich, in dem eine Umsetzung möglich ist. Das durch eine zusätzliche Wasserstoffbrücken-Bindung zu Asn209 gut in der I-Helix gebundene Wasser verweilte sehr nahe am Sauerstoff-Molekül. Diese Nähe erleichtert die Umsetzung durch Lieferung von Protonen. Corticosteron kann im aktiven Zentrum der CYP2A5-Mutanten F209N binden und erfüllt dort die Abstandskriterien, die für eine erfolgreiche Umsetzung notwendig sind (vgl. Abb. 6.29).

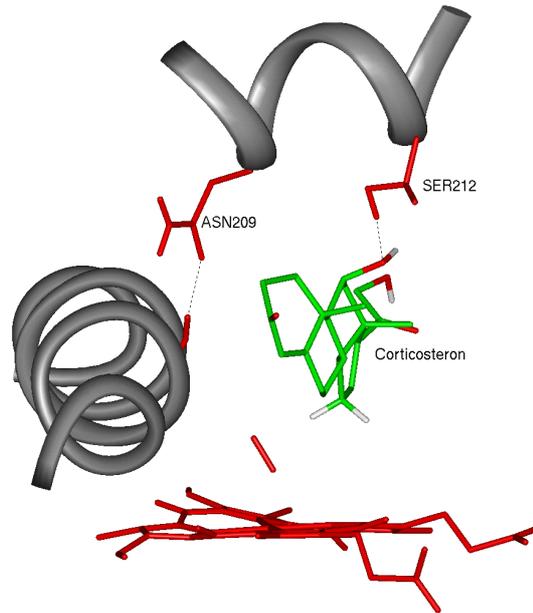


Abbildung 6.28: Abbildung der Endstruktur der F209N-Dynamik mit Corticosteron. Die C_{11} -Hydroxyl-Gruppe des Corticosterons bildet eine Wasserstoffbrücken-Bindung zu Serin 212 aus.

Dynamik mit Deoxycorticosteron Die Verhältnisse bei Deoxycorticosteron waren denen mit Corticosteron sehr ähnlich. Auch Deoxycorticosteron blieb im aktiven Zentrum gebunden und wurde nicht durch die Seitenkette von Asn209 aus seiner Position verdrängt. Beide untersuchten Abstände ($Fe \rightarrow C_{15}$; $O_{\text{Wasser}} \rightarrow O1$) blieben während der gesamten Simulationsdauer in Bereichen, in denen eine Umsetzung möglich ist (vgl. Abb. 6.29). Durch die fehlende Hydroxyl-Gruppe in Position C_{11} kann Deoxycorticosteron keine zusätzliche Wasserstoffbrücken-Bindung eingehen. Es blieb in seiner Position stabil gebunden und wurde nicht weiter aufgerichtet. Dies spielt bei der Ausrichtung der C-H-Bindung eine wichtige Rolle.

Unterscheidung Nach den oben beschriebenen Ergebnissen, die sich hauptsächlich auf die Auswertung von Abständen im aktiven Zentrum stützen, kann man zu dem Schluss kommen, dass Corticosteron und Deoxycorticosteron gleich gut von der CYP2A5-Mutante F209N umgesetzt werden können. Tatsächlich ist die Umsetzungsrate für Corticosteron aber doppelt so hoch wie die für Deoxycorticosteron (16 bzw. $8 \frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{nmol(P450)}}$). Allein aus den Abständen des I-Helix-Wassers zum Sauerstoff-Mole-

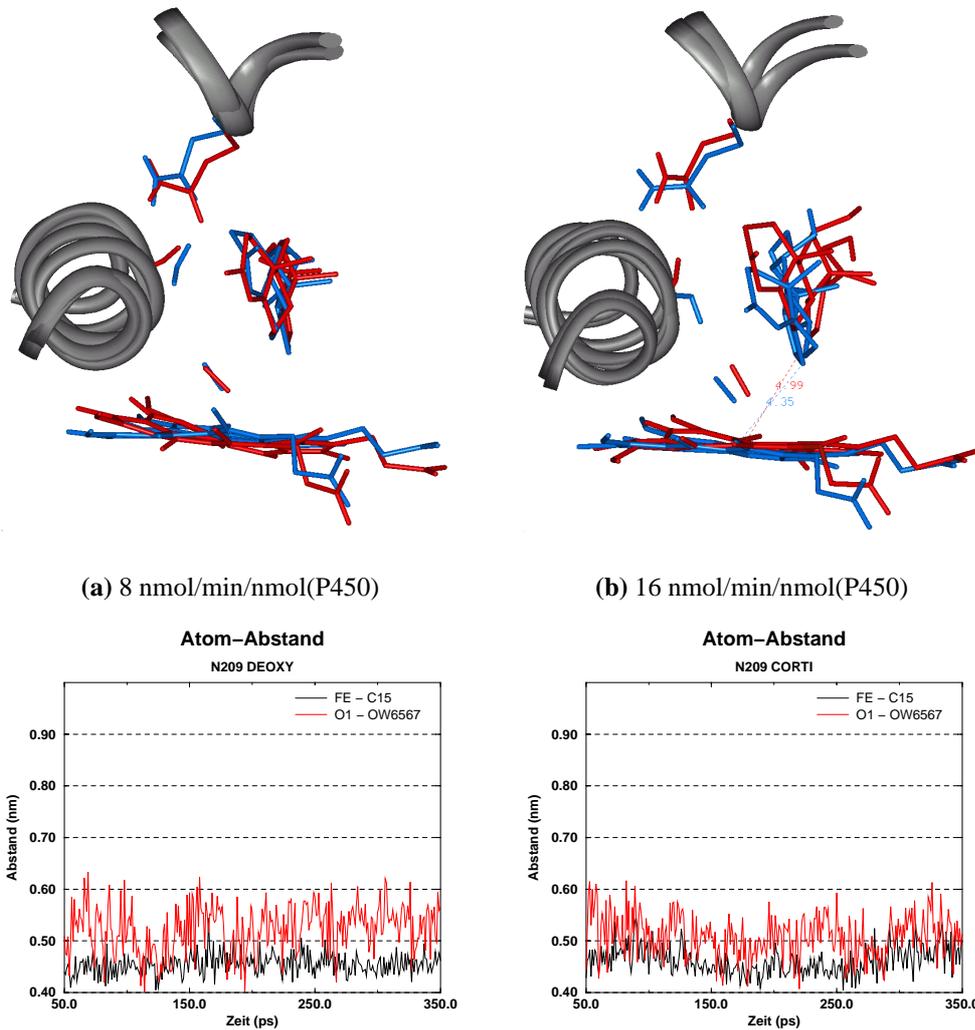


Abbildung 6.29: Die oberen Abbildungen zeigen einen Blick ins aktive Zentrum der F209N-Mutante mit gebundenem Deoxycorticosteron (links) bzw. Corticosteron (rechts). Dargestellt sind jeweils die Startstruktur vor der Dynamik (blau) und die Endstruktur der Dynamik (rot) sowie in grau das Rückgrat der I-Helix, das zur Überlagerung der Strukturen benutzt wurde. Asn209 bildet eine Wasserstoffbrücken-Bindung mit dem dargestellten Wassermolekül der I-Helix aus. Die jeweiligen Umsatzraten für die Substrate sind unter den Abbildungen angegeben [(a) + (b)]. Die Graphen zeigen den Abstand des C₁₅-Atoms vom Häm-Eisen (schwarz) und den Abstand des O₁-Sauerstoffs zum Sauerstoff-Atom des Wassers in der I-Helix (rot).

kül und von C₁₅ zum Häm-Eisen ist dieses Verhalten nicht erklärbar. Um den Unterschied zwischen den beiden Substraten erklären zu können, wurde bei den Dynamiken die Ausrichtung der zu hydroxylierenden C-H-Bindung untersucht.

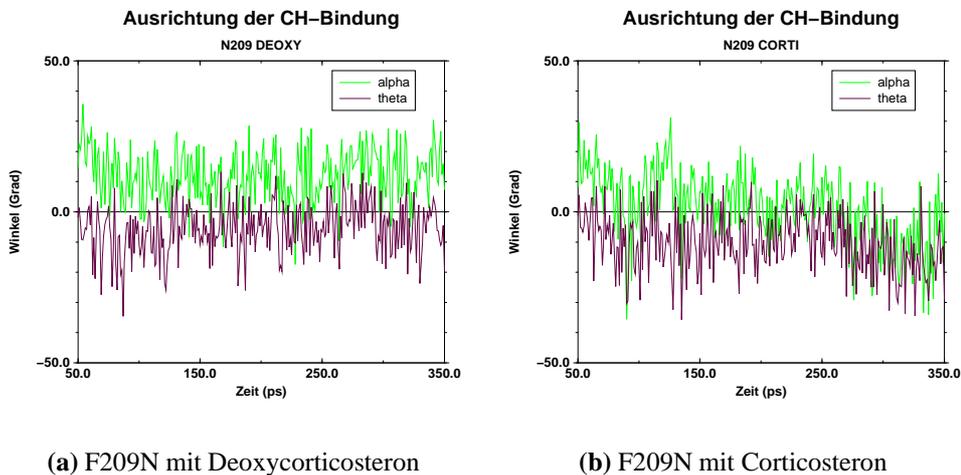


Abbildung 6.30: Verlauf der alpha- und theta-Winkel bei den Dynamiken von F209N mit Deoxycorticosteron (links) und Corticosteron (rechts).

In Abbildung 6.30 ist das Ergebnis der Untersuchung dargestellt. Man erkennt, dass die theta-Winkel in beiden Dynamiken vergleichbar laufen und sehr oft in der optimalen Anordnung, ohne Abweichung aus der FE-O1-C₁₅-Ebene, auftreten. Nicht gleichlaufend ist die Ausrichtung des alpha-Winkels. Während bei der Dynamik mit Corticosteron der Verlauf des alpha-Winkels nahe an dem des theta-Winkels ist und beide relativ häufig gemeinsam die optimale Ausrichtung von null Grad passieren, ist der Verlauf des alpha-Winkels in der Dynamik mit Deoxycorticosteron deutlich von dem des theta-Winkels abgesetzt. Während theta nahe bei der 0 Grad-Marke verläuft weicht der alpha-Winkel deutlich von null ab. Dies ist bedingt durch die oben erwähnte fehlende senkrechte Ausrichtung des Deoxycorticosterons im Gegensatz zum Corticosteron. Durch seine stärkere "Schieflage" zeigt die C-H-Bindung nicht in Richtung O1 des Sauerstoff-Moleküls, sondern häufiger zwischen O1 und Häm-Eisen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die gemessenen Abstände alleine nur eine generelle Aussage zulassen, ob eine Umsetzung stattfinden kann. Sie konnten in diesem Beispiel keine ausreichende Erklärung für das unterschiedliche Ausmaß der

Umsetzung geben. Erst die ausgemessenen Winkel eröffnen eine feinere Unterscheidungsmöglichkeit.

6.10 Mutation F209L

6.10.1 Bau und Dynamik ohne Substrat

Ebenso wie beim Bau der F209N-Mutante, wurde auch zum Aufbau der F209L-Mutante die Seitenkette der Aminosäure 209 aus der Wildtyp-Struktur nach 1800 ps freier Dynamik umgewandelt. Durch die Verkleinerung des Phenylalanins in ein Leucin entstand im aktiven Zentrum ein freier Raum, der durch erneutes automatisches Auffüllen der Box mit Wasser geschlossen wurde. Dabei wurde im aktiven Zentrum genau ein Wassermolekül eingefügt. Bei der F209N-Mutante war dieses Vorgehen nicht notwendig, weil sich das entstandene Vakuum hier, auf Grund der besseren Wechselwirkungsmöglichkeiten des Asparagins N209, nicht nachteilig auf die Dynamiken ausgewirkt hatte. Es folgten Energieminimierung und Moleküldynamik-Simulationen für insgesamt 700 ps. Auch hier zeigte sich eine schnelle energetische Äquilibration und nur eine geringe Bewegung des Proteinrückgrats (s. Abb. 6.31).

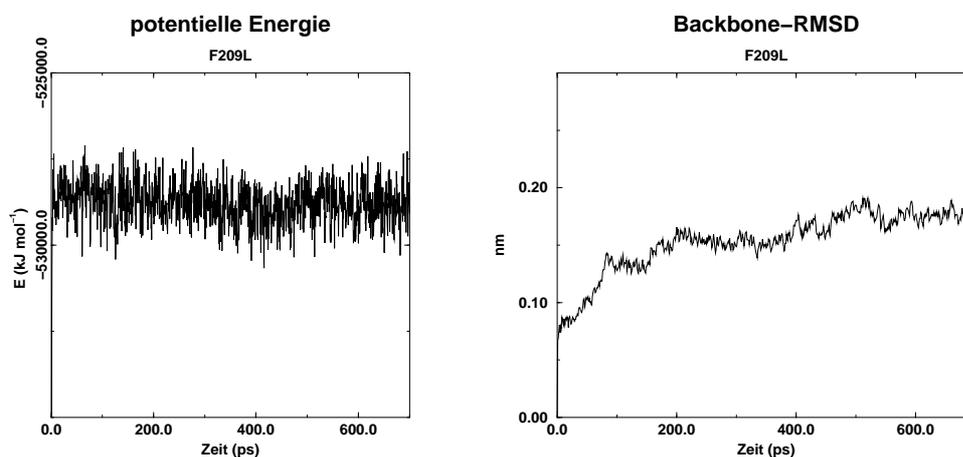


Abbildung 6.31: Verlauf der Potentialkurve (links) und des RMSD-Wertes für die Abweichungen des Proteinrückgrats (rechts) während der Dynamik der F209L-Mutante.

Die Untersuchung der letzten 100 ps der Dynamik zeigte ähnliche Ergebnisse wie die Dynamik von F209N (s Tab. 6.9). Für die weitere Arbeit wurde die Struktur nach 600 ps Dynamik ausgewählt. Sie beinhaltet zwar einen zu engen Atomkontakt, der in 100 Schritten Minimierung nicht zu beheben war, aber als einzige der untersuchten Strukturen liegt hier Aminosäure 303 nicht in einer energetisch ungünstigen Konformation vor. Aminosäure 303 befindet sich in der Nähe des aktiven Zentrums und liegt in der I-Helix zwischen den Aminosäuren 301 und 305, die das Wasser in der I-Helix binden. (Auch bei den anderen durchgeführten Dynamiken befand sich Aminosäure 303 nicht in einer ungünstigen Region des Ramachandran-Plots.)

Tabelle 6.9: Ergebnisse der PROCHECK-Untersuchungen von 11 Frames aus den letzten 100 ps der freien Dynamik der F209L-Mutante

Frame	Anteil Aminosäuren in den Bereichen (in %)				ungünstige Kontakte	G-Faktor (gesamt)
	favorisiert	günstig	weniger günstig	ungünstig		
600 ps	76,8	20,5	1,2	1,5	1	-0,16
610 ps	80,5	16,5	1,5	1,5	0	-0,17
620 ps	81,8	16,2	0,5	1,5	0	-0,15
630 ps	80,0	18,0	0,8	1,2	1	-0,18
640 ps	79,5	18,2	1,0	1,5	1	+0,08
650 ps	78,0	20,2	0,2	1,5	2	-0,17
660 ps	79,8	18,8	0,0	1,5	1	-0,18
670 ps	79,2	18,8	0,5	1,5	0	-0,18
680 ps	80,0	17,5	1,0	1,5	0	-0,16
690 ps	81,0	16,2	1,2	1,5	0	-0,18
700 ps	80,8	16,0	1,5	1,8	0	-0,18

6.10.2 Dynamik und Ergebnisse (F209L)

Experimentelle Ergebnisse Die F209L-Mutante ist in der Lage Deoxycorticosteron mit hoher Geschwindigkeit umzusetzen ($16 \frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{nmol(P450)}}$). Corticosteron wird von dieser Mutante überhaupt nicht umgesetzt. Die Mutation von Phenylalanin zu Leucin ermöglicht also ebenso wie die Mutation zu Asparagin die Umsetzung von Steroiden im aktiven Zentrum der CYPs.

Wasser in der I-Helix Auch bei den Dynamiken mit der F209L-Mutante fand sich ein Wassermolekül, das von Aminosäuren der I-Helix gebunden wurde (s. Abb. 6.32). Der gemessene Abstand war größer als bei der F209N-Mutante, bei der das Wassermolekül durch eine Wasserstoff-Brücke zu N209 noch zusätzlich fixiert und in seiner Beweglichkeit eingeschränkt wurde. Zieht man als Vergleich die Wildtyp-Dynamik heran

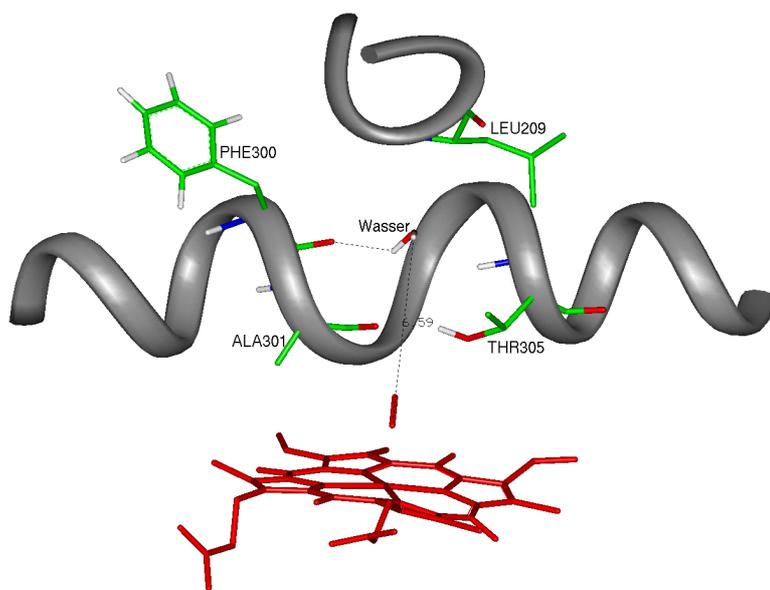


Abbildung 6.32: Wasserstoffbrücken-Muster in der Aufweitung der I-Helix (grau) der F209L-Mutante. Das essentielle Wasser ist gebunden an Phe300. Die Aminosäuren Ala301 und Thr305 können nach geringer Bewegung des gebundenen Wassers auch Wechselwirkungen eingehen. Der Abstand des Wassers zum O1 des Sauerstoff-Moleküls beträgt beim abgebildeten Schlußframe der Dynamik 6,59 Å.

(s. Abb. 6.23), bei der das Wasser auch die größere Beweglichkeit besitzt, so erkennt man, dass der Abstand bei der F209-Deoxycorticosteron-Dynamik mit 6 - 7 Å etwa gleich groß ist, wie bei der L209-Corticosteron-Dynamik (s. Abb. 6.33). Der Durchschnittswert der L209-Deoxycorticosteron-Dynamik scheint leicht höher zu liegen, es zeigen sich aber immer wieder deutliche Bewegungen, die den Abstand auf unter 6 Å verkleinern. Eine Unterbrechung der Wasserkette, welche die für die Reaktion benötigten Protonen ins aktive Zentrum liefert, wie bei der F209-Corticosteron-Dynamik, ist hier nicht zu beobachten.

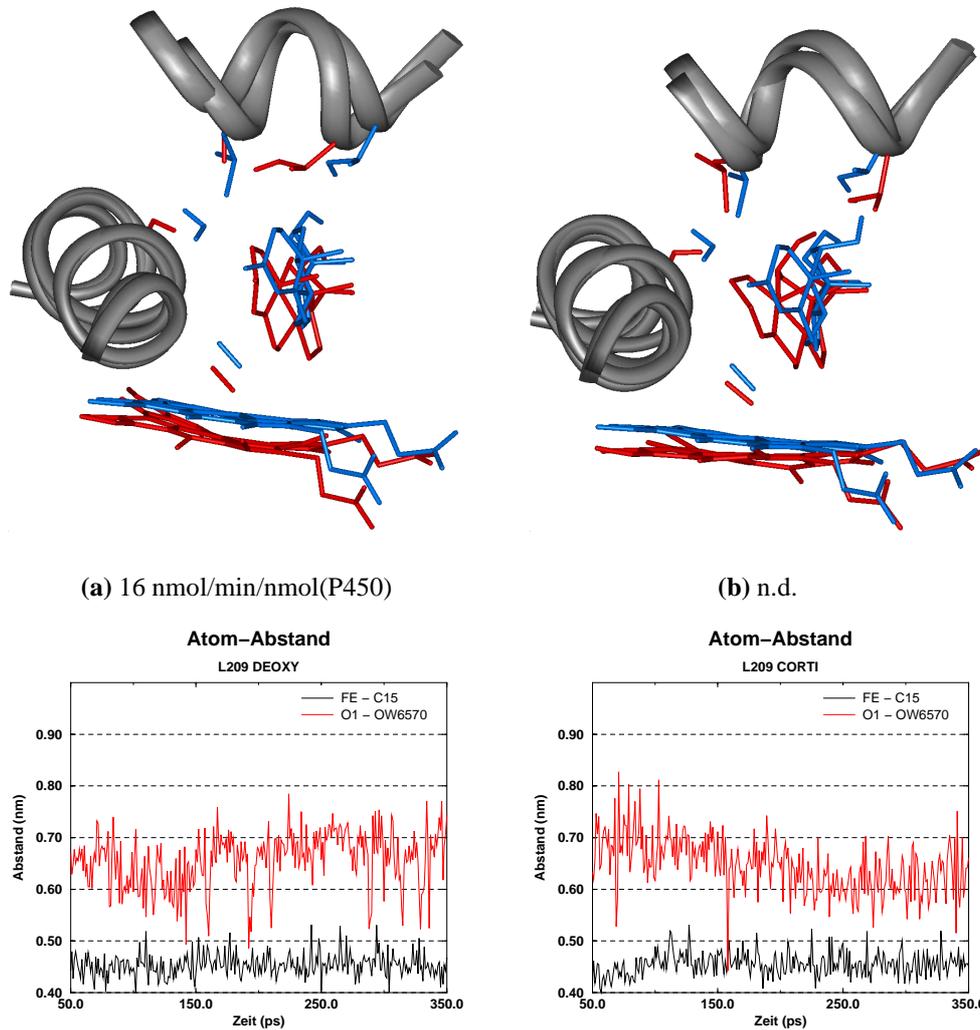


Abbildung 6.33: Die oberen Abbildungen zeigen einen Blick ins aktive Zentrum von F209L mit gebundenem Deoxycorticosteron (links) bzw. Corticosteron (rechts). Dargestellt sind jeweils die Startstruktur vor der Dynamik (blau) und die Endstruktur der Dynamik (rot) sowie in grau das Rückgrat der I-Helix, das zur Überlagerung der Strukturen benutzt wurde. Die jeweiligen Umsatzraten für die Substrate sind unter den Abbildungen angegeben [(a) + (b)]. Die Graphen zeigen den Abstand des C₁₅-Atoms vom Häm-Eisen (schwarz) und den Abstand des O₁-Sauerstoffs zum Sauerstoff-Atom des Wassers in der I-Helix (rot).

Dynamik mit Corticosteron Im Verlauf der Dynamik bewegte sich die Seitenkette von Leucin 209 seitlich aus dem aktiven Zentrum heraus (s. Abb. 6.32). Durch diese Bewegung wurde im aktiven Zentrum so viel Raum geschaffen, dass das Corticosteron

mit seiner Hydroxyl-Gruppe in C_{11} als Wasserstoffbrücken-Donator fungieren konnte (im Gegensatz zur F209N-Dynamik). Diese veränderte Bindungsgeometrie hatte eine Drehung des Corticosterons um seine Längsachse zur Folge, die nach ca. 80 ps Dynamik erfolgte (s. Abb. 6.34 und 6.35).

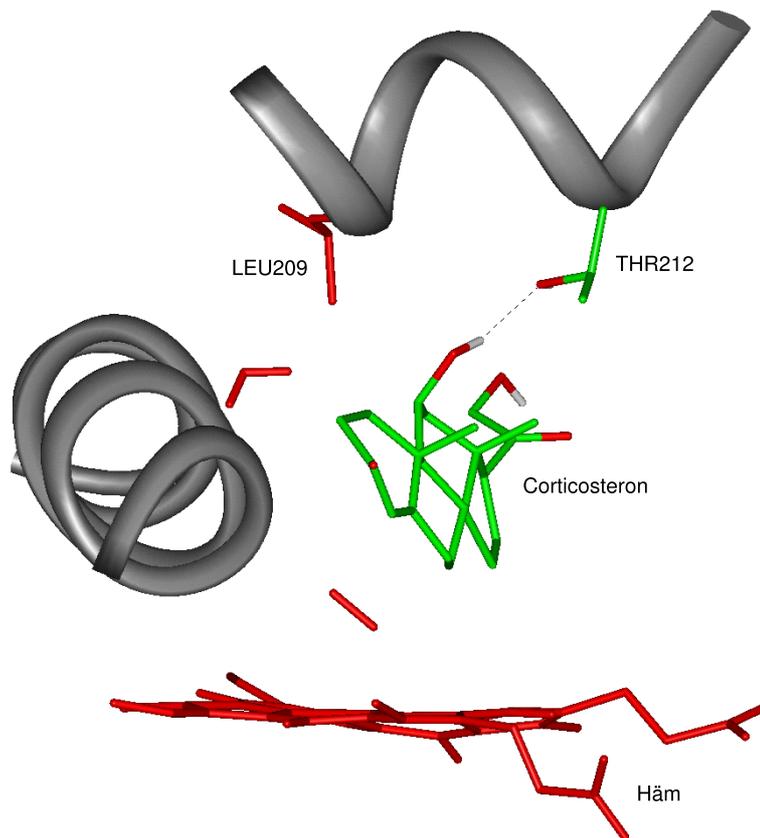


Abbildung 6.34: Blick ins aktive Zentrum der Endstruktur der Dynamik der F209L-Mutante. Corticosteron doniert eine Wasserstoffbrücken-Bindung zu Thr212.

Obwohl der C_{15} -Fe-Abstand auch nach der Drehung während der Dynamik nahezu konstant bleibt, drehte sich die C-H-Bindung von Sauerstoff weg und es kommt zu keiner Umsetzung mehr (s. Abb. 6.35). Während der theta-Winkel um die optimale Ausrichtung schwankte, lag der alpha-Winkel nach der Drehung des Corticosterons deutlich im positiven Bereich.

Die Drehung des Corticosterons bewegt das Wasserstoffatom aus der optimalen Ausrichtung zum Sauerstoff O1 heraus. Die optimale Ausrichtung von C-H-O in gera-

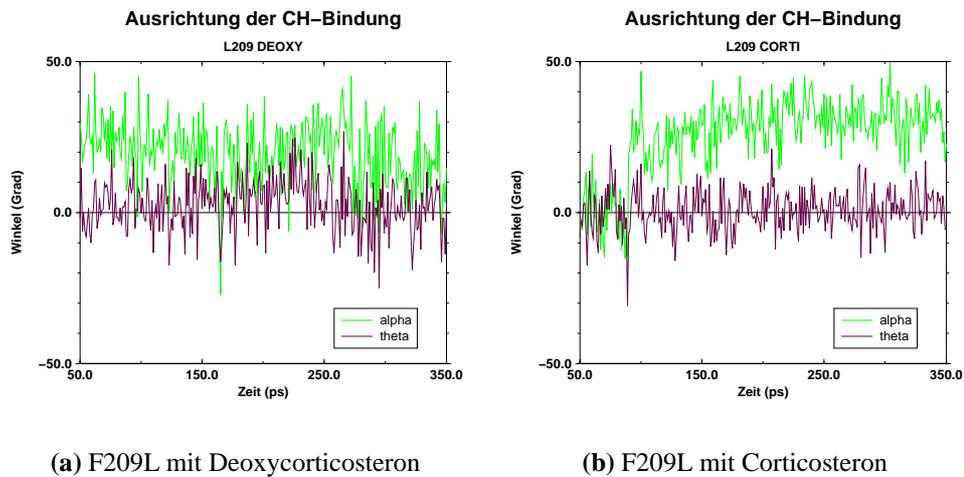


Abbildung 6.35: Verlauf der Veränderung der alpha- und theta-Winkel bei den Dynamiken von F209L mit Deoxycorticosteron (links) und Corticosteron (rechts).

der Linie ($\sphericalangle 180^\circ$) wird nach der Drehung nicht mehr annähernd erreicht (s. Abb. 6.36).

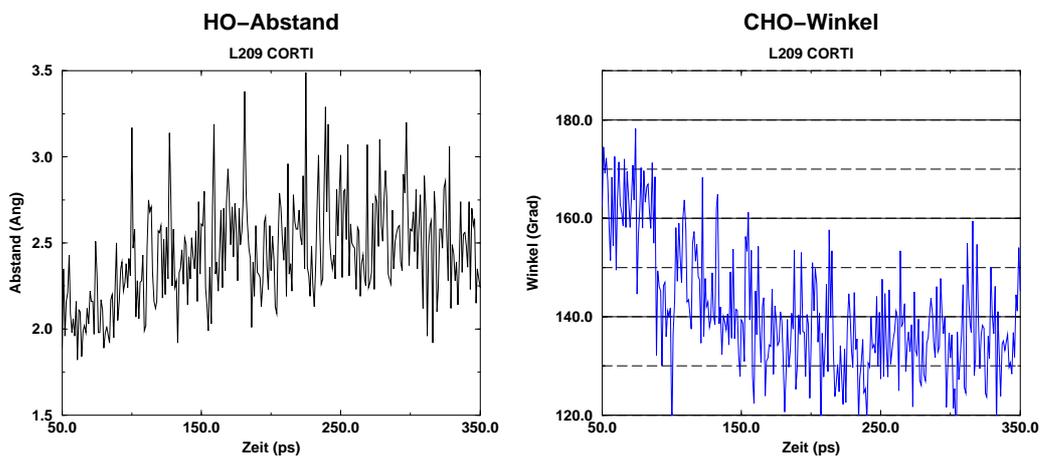


Abbildung 6.36: Links: Abstand des Wasserstoffatoms an C_{15} zum O1-Atom des Sauerstoffmoleküls; rechts: Winkel zwischen C_{15} -Atom, Wasserstoff an C_{15} und O1-Atom (CHO-Winkel).

Dynamik mit Deoxycorticosteron Der Abstand von Kohlenstoff-Atom C₁₅ zum Häm-Eisen verläuft auch bei der Dynamik mit Deoxycorticosteron zwischen 4 - 5 Å, Voraussetzung für eine gute Umsetzung. Der Abstand von Wasser in der I-Helix zum Sauerstoffmolekül oberhalb des Häms ist wie oben beschrieben durchschnittlich größer als bei der gut umsetzenden Kombination F209N/Corticosteron, verkleinert sich aber während der Dynamik immer wieder auf Werte unterhalb von 6 Å, die im Bereich der günstigen Kombinationen liegen.

Die Ausrichtung der C-H-Bindung ähnelt am stärksten der Ausrichtung von Deoxycorticosteron in der F209N-Mutante (s. Abb. 6.30 und 6.35). Die Umsetzungsrate der F209L-Mutante für Deoxycorticosteron ist aber doppelt so hoch wie bei der F209N-Mutante. Bei genauer Analyse der Graphen ergibt sich, dass der alpha-Winkel bei beiden Dynamiken etwa bei +10° bis +15° verläuft. Ein Unterschied ist im Kurvenverlauf des theta-Winkels zu erkennen. Während der theta-Winkel bei der F209L/Deoxycorticosteron-Kombination durchschnittlich im positiven Bereich mit einer Abweichung von ca. +5° verläuft, zeigt sich bei der F209N/Deoxycorticosteron-Kombination eine durchschnittliche negative Abweichung im Bereich von ca. -10°. Die geringere Abweichung vom Idealwert erklärt die größere Umsetzungsrate der F209L/Deoxycorticosteron-Kombination.

6.11 Zusammenfassung der Ergebnisse

6.11.1 Gemeinsame Kontakte

Bei allen Dynamiken wurden die beiden Substrate Corticosteron und Deoxycorticosteron durch weitere Wechselwirkungen mit Aminosäuren im aktiven Zentrum festgehalten. Diese Wechselwirkungen traten immer auf und wurden bisher noch nicht beschrieben, weil sie keine Erklärung für die Unterschiede der Umsetzungsraten bei den einzelnen Mutanten lieferten. Besonders herauszuheben ist die Wechselwirkung mit Asparagin 297, das eine stabile Wasserstoffbrücken-Bindung mit der Carbonyl-Funktion in Position 3 der Steroide eingeht (s. Abb. 6.37). Als alternative Bindungsmöglichkeit steht für die Carbonyl-Funktion noch Thr106 zur Verfügung. Bei Bindung an Thr106 kann die Wasserstoff-Brücke der C₁₇-Seitenkette der Steroide mit einem

Backbone-Atom von Phe480 nicht mehr gehalten werden. Auch hier sind mit Thr308 und Thr309 Bindungsalternativen möglich. Die relative Position des Substrats zum Häm ändert sich dabei nicht, weil es sich um eine Drehung um die Eisen-Sauerstoff-Achse handelt.

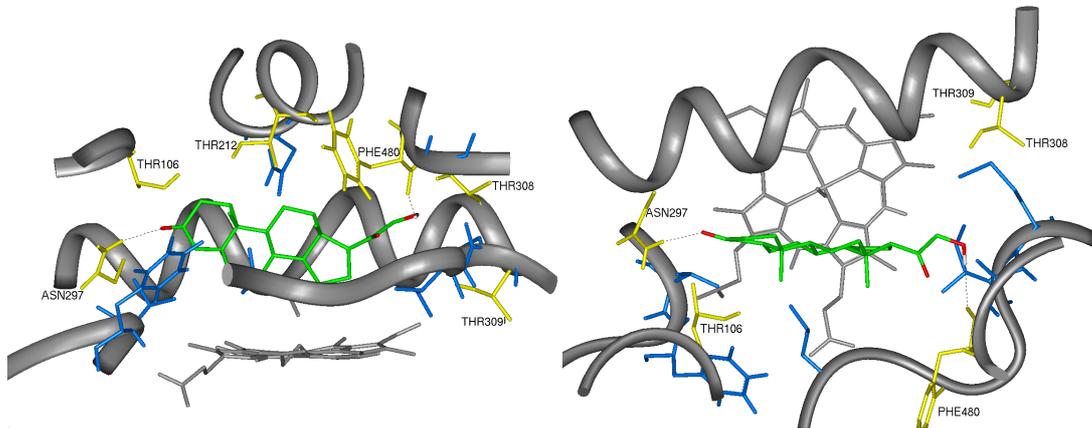


Abbildung 6.37: Beispielhafte Darstellung der Wechselwirkungen, die Corticosteron und Deoxycorticosteron im aktiven Zentrum der CYP2A-Mutanten eingehen können (links: parallel zur Häm-Ebene; rechts: Ansicht von oben auf das Häm). Gelb dargestellte Aminosäuren konnten in den Dynamiken Wasserstoffbrücken-Bindungen zu den Substraten ausbilden. Die schwarz gestrichelten Linien deuten die Wasserstoff-Brücken an. Die blauen dargestellten Aminosäuren sind größtenteils hydrophob und kleiden das aktive Zentrum aus. Nicht dargestellt sind im aktiven Zentrum vorhandene Wassermoleküle.

Weitere Kontakte hydrophober Natur bestehen unter anderen mit den Aminosäuren Leu107, Phe108 sowie Ile365 und Leu370. Ausserdem ist im aktiven Zentrum ein zusammenhängendes Netzwerk aus Wassermolekülen vorhanden, von denen einige auch mit der C₁₇-Seitenkette wechselwirken.

6.11.2 Auswertung der Dynamiken

Es folgt nun eine Übersicht der Auswertungen für die einzelnen Parameter der verschiedenen Mutanten auf einer Seite. Sie erlauben einen direkten Vergleich der einzelnen Parameter auf einen Blick.

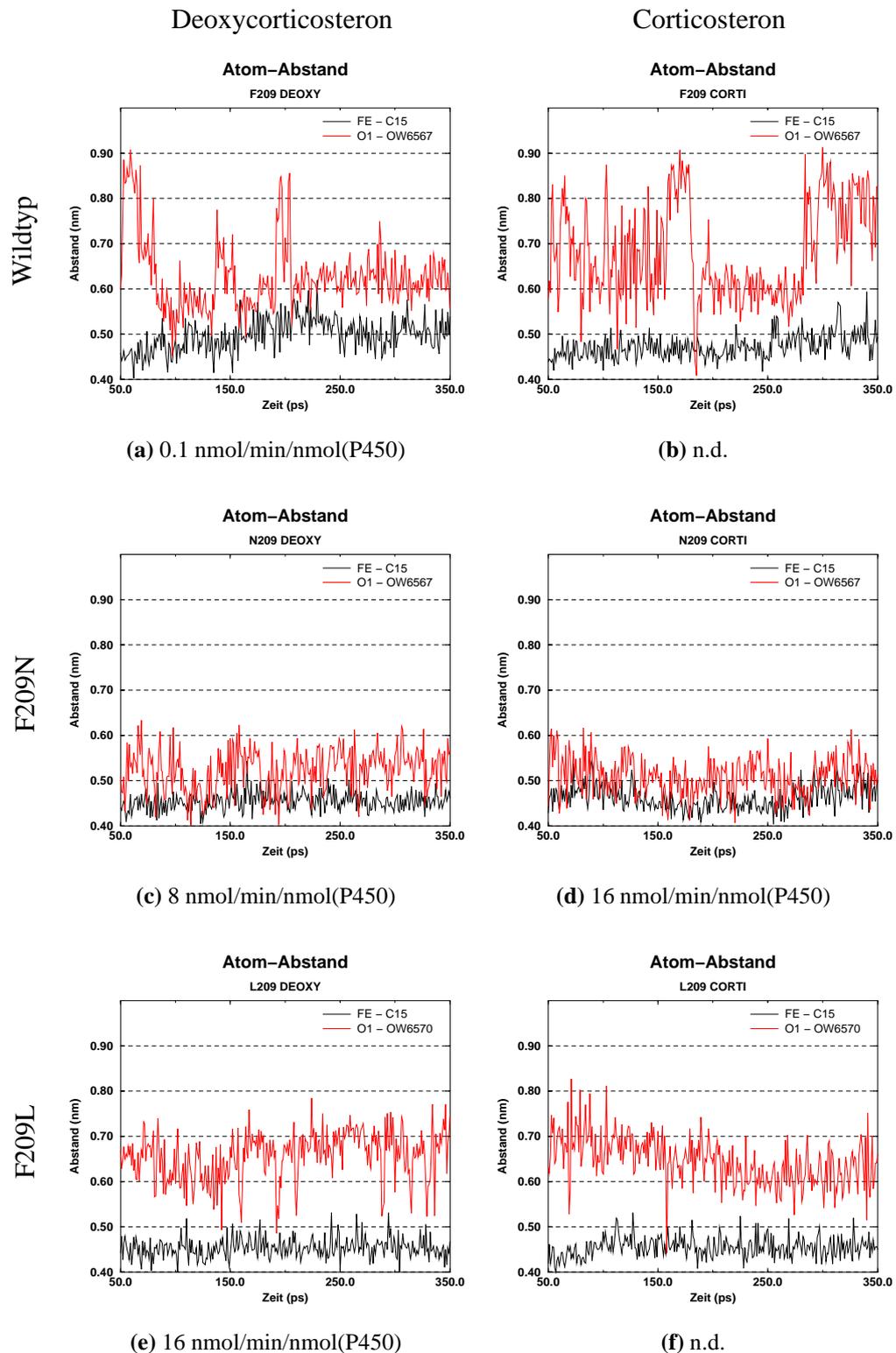


Abbildung 6.38: Auswertung der gemessenen Abstände in allen durchgeführten Dynamiken (Wildtyp und Mutanten mit Deoxycorticosteron (links) und Corticosteron (rechts)). Die Umsetzungsraten der einzelnen Kombinationen sind unterhalb der Diagramme angegeben.

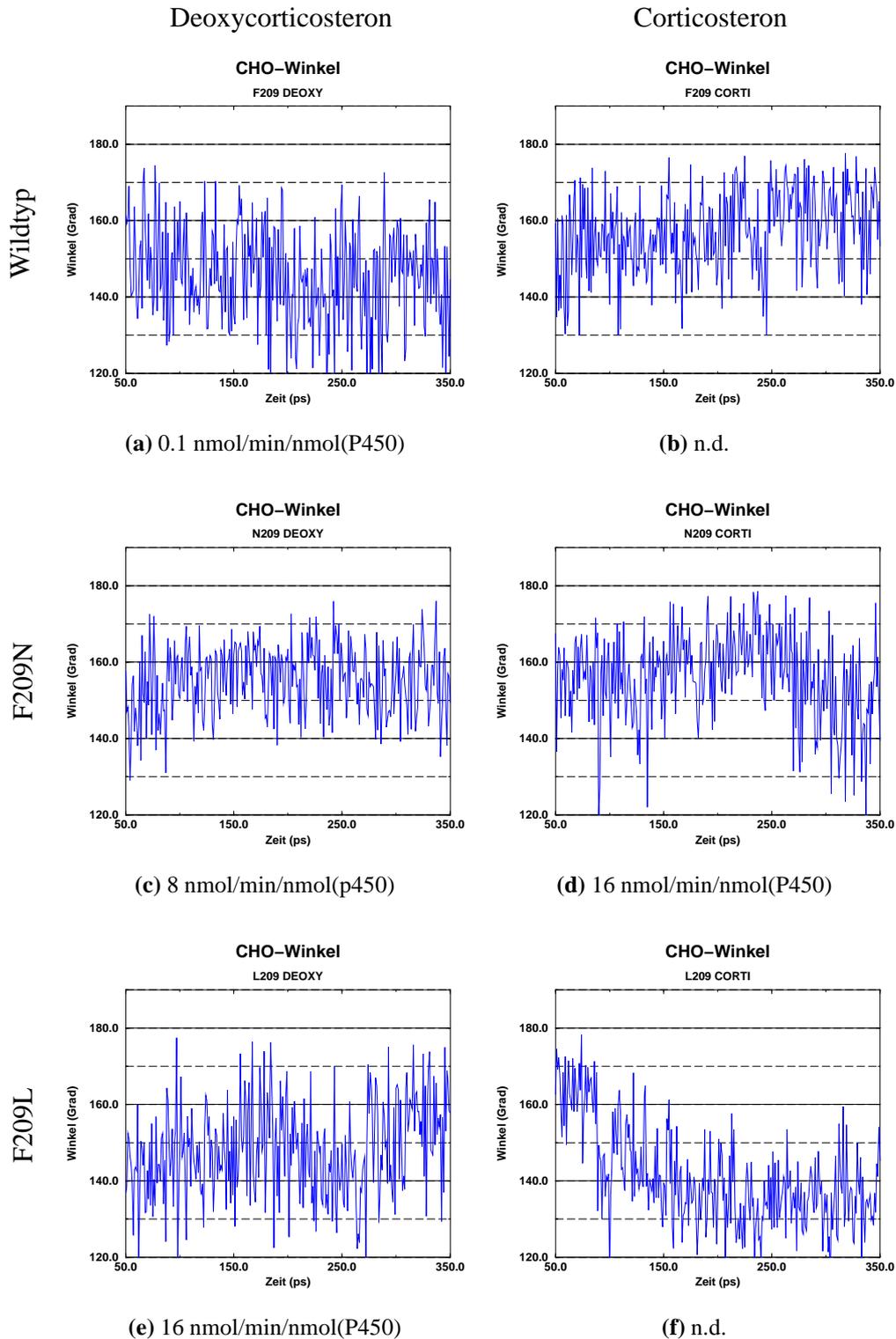


Abbildung 6.39: CHO-Winkel-Auswertung in allen durchgeführten Dynamiken (Wildtyp und Mutanten) mit Deoxycorticosteron (links) und Corticosteron (rechts). Die Umsetzungsraten der einzelnen Kombinationen sind unterhalb der Diagramme angegeben.

6.12 Mutation G207P

Um das Modell weiter abzusichern, wurde noch eine weitere Mutante des Enzyms betrachtet. Es handelt sich dabei um eine von Juvonen und Negishi durchgeführte Untersuchung an einer G207P-Mutante von CYP2A5 [99]. Die Mutation von Glycin in Position 207 zu Prolin bewirkt die komplette Überführung in einen Low-spin-Komplex und damit eine Verschiebung der Absorptionsmaxima des Enzyms. Im Low-spin-Komplex ist das Eisen mit Wasser als sechstem Ligand abgesättigt und weist daher eine geringere Grundaktivität auf.

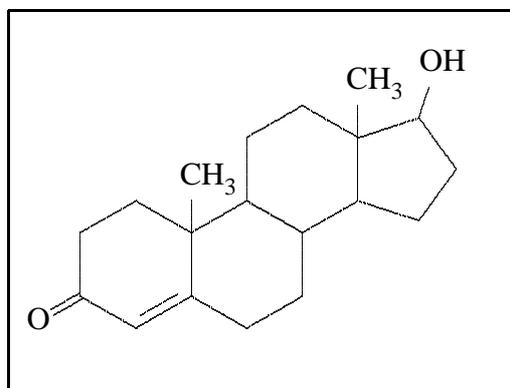


Abbildung 6.41: Strukturformel von Testosteron

Das Steroid Testosteron (Abb. 6.41) wird vom CYP2A5-Wildtyp nur in sehr geringem Ausmaß umgesetzt und ist ein schlechter Inhibitor der 7-Hydroxylase-Aktivität von CYP2A5. Das wird aus den hohen K_D - und K_i -Werten von 340 bzw. $85 \pm 9 \mu\text{M}$ deutlich. Daraus kann man schließen, dass das aktive Zentrum von CYP2A5 für das voluminöse Testosteron zu eng ist.

Bei der G207P-Mutante sind diese Werte um den Faktor 20 bzw. 10 kleiner ($K_D = 16$ bzw. $K_i = 9,6 \pm 1,7 \mu\text{M}$). Das bedeutet, dass Testosteron besser ins aktive Zentrum der Mutante passt, dort gebunden wird und damit auch die 7-Hydroxylierung von Cumarin besser inhibieren kann. Trotz der besseren Bindung verschwindet die beim Wildtyp noch schwach vorhandene Hydroxylase-Aktivität gegenüber Testosteron bei der G207P-Mutante fast völlig (Wildtyp: $1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{nmol}(P450)^{-1}$; G207P: $< 0,05 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{nmol}(P450)^{-1}$). Die Autoren schließen daraus, dass das aktive Zentrum der G207P-Mutante größer ist als beim Wildtyp, weil Testosteron jetzt besser im

aktiven Zentrum gebunden werden kann. Die Veränderung ist so stark, dass das nun gut gebundene Testosteron keine Position mehr findet, in der eine Umsetzung möglich ist. Auf die Mutation wird die Vergrößerung nicht direkt zurückgeführt, weil die Aminosäure in Position 207 nur bedingt am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligt ist. Die Erklärung wird vielmehr darin gesehen, dass Position 207 gemeinsam mit der wichtigen Aminosäure 209 in der F-Helix lokalisiert ist und eine Mutation von Gly207 sich daher auf die Positionierung anderer Aminosäuren (besonders Phe209) auswirkt.

Die große Bedeutung des Aminosäuretyps in Position 209 auf die Testosteron-Bindung erkennt man auch aus den experimentellen Daten für das eng mit CYP2A5 verwandte Enzym CYP2A4 (Identität: 97%). Dieses ist durch seine gute Testosteron-Umsetzung charakterisiert. Der wichtigste Unterschied zwischen den beiden Proteinen besteht in Position 209, die ein Leucin anstelle des Phenylalanins bei CYP2A5 trägt. Hier bewirkt die Vergrößerung des aktiven Zentrums allerdings nicht nur eine verbesserte Bindung des Testosterons, sondern es ist auch eine gute Umsetzung möglich.

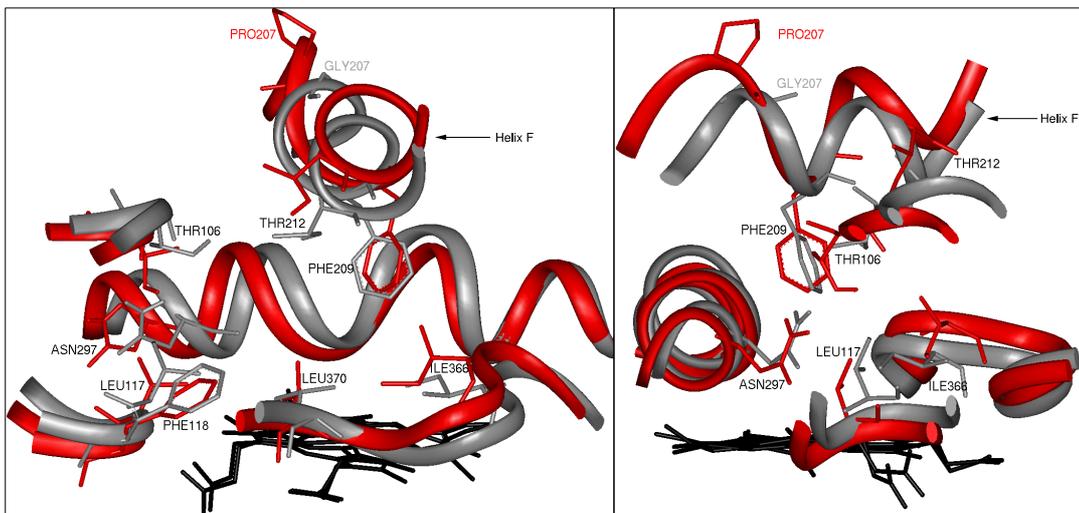


Abbildung 6.42: Vergleich der äquilibrierten Wildtyp-Struktur von CYP2A5 (grau) mit der Endstruktur der G207P-Dynamik (rot). Die Überlagerung erfolgte über das Häm (schwarz). Links: Frontalansicht; rechts: Seitenansicht parallel zur I-Helix. Die oben gelegene F-Helix, Thr106, Asn297 und Ile366 haben sich in der G207P-Dynamik vom Häm weg bewegt und vergrößern das aktive Zentrum.

Um die aufgestellten Hypothesen zu überprüfen, wurde in der schon vorher verwendeten äquilibrierten Wildtyp-Struktur (nach 1800 ps freier Dynamik) Glycin 207 gegen Prolin ausgetauscht. Die entstandene Struktur wurde energieminiert und anschließend, analog den Dynamiken der Position 209-Mutanten, einer Moleküldynamik-Simulation von 700 ps unterzogen. Abbildung 6.42 zeigt einen Vergleich der äquilibrierten Wildtyp-Struktur und der Schlussstruktur der G207P-Dynamik.

Man erkennt, dass sich die Position der wichtigen Aminosäure Phe209 kaum verändert hat. Trotzdem ist das aktive Zentrum der G207P-Mutante deutlich größer, weil sich die F-Helix vor und nach Phe209 vom aktiven Zentrum weggebogen hat. Außerdem wurde die Aufweitung der I-Helix vergrößert, womit sich Asn297, das einen wichtigen Bindungspartner für die Substrate beim Wildtyp darstellt, vom Häm weg bewegt und das aktive Zentrum auf dieser Seite vergrößert wird. Auch Thr106, das als alternativer Bindungspartner zu Asn297 zur Verfügung steht, ist nach außen verschoben. Die größte Bewegung findet allerdings in der F-Helix statt. Durch den Einbau des Prolins ist hier ein Knick in der Helix entstanden, der eine Bewegung der Aminosäuren vor und nach Phe209 vom Häm weg bewirkt. Das C α -Atom von Thr212 wandert um 2,33 Å – vom Häm aus gesehen – nach oben. Durch dieses zusätzliche Volumen ist es für Testosteron möglich, im aktiven Zentrum der G207P-Mutante gebunden zu werden. Abbildung 6.43 zeigt eine mögliche Position für das Testosteron im aktiven Zentrum der G207P-Mutante. Bei Aufrechterhaltung einer Wasserstoffbrücken-Bindung zu Asn297 beträgt der Abstand der C-Atome 7 und 15 im Testosteron zum Häm-Eisen 5,36 Å bzw. 6,52 Å (Optimalabstand für die Hydroxylierung: 4-5 Å). Bei dieser großen Entfernung ist über dem Häm noch genügend Raum, um einem Wassermolekül weiterhin eine Koordination zum Häm zu ermöglichen. Dieser Zustand entspricht dem experimentell beobachteten low-spin-Komplex, in dem keine Umsetzung von Substraten möglich ist.

Bei Positionierung von Testosteron in identischer Ausrichtung und gleich großer Entfernung zum Häm im aktiven Zentrum des Wildtyps, erkennt man die großen Überlappungen von Proteinatomen mit Atomen des Testosterons, das heißt eine Bindung, in einem solch großen Abstand, ist im Wildtyp nicht möglich. Die einzige Möglichkeit für das Testosteron liegt im Ausweichen in Richtung des Häms, wodurch das Wasser über dem Häm verdrängt wird und es zu einem Wechsel des Enzyms in einen

high-spin-Zustand kommt. Nun kann bei Erfüllung aller Voraussetzungen eine Hydroxylierung ablaufen. Diese Voraussetzungen sind bei Testosteron, erkennbar an seiner relativ kleinen Umsetzungsrate, selten erfüllt.

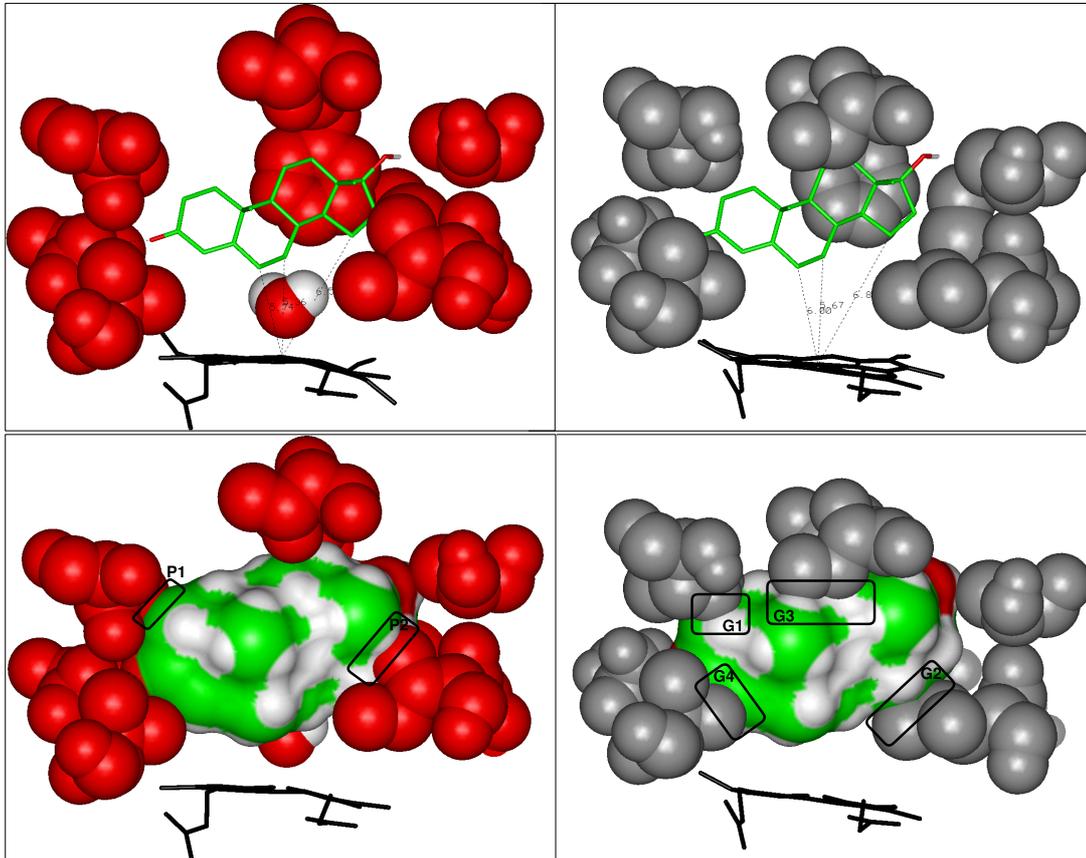


Abbildung 6.43: Darstellung von Testosteron (nach Atom-Typen eingefärbt; oben als Stäbchen-Modell, unten repräsentiert durch seine Oberfläche) im aktiven Zentrum der Endstruktur der G207P-Dynamik (links) und des Wildtyps nach 1,4 ns freier Dynamik (rechts) aus identischen Blickwinkeln. P1 und P2 zeigen leichte Überlagerungen in der G207P-Mutante; G1 - G4 zeigen große Überlappungen des Testosterons mit Aminosäuren des aktiven Zentrums im Wildtyp auf.

Die auf Grund der Experimente aufgestellten Hypothesen konnten mit Hilfe des Modells bestätigt werden. Das aktive Zentrum der G207P-Mutante besitzt tatsächlich ein größeres Volumen und kann somit Testosteron besser aufnehmen. Dies erklärt die bessere Inhibition der Cumarin-Umsetzung durch Testosteron bei der G207P-Mutante. Die experimentell gefundene geringere Umsetzung von Testosteron durch die G207P-

Mutante kann auch durch das größere aktive Zentrum erklärt werden. Testosteron in der G207P-Mutante in so großer Entfernung zum Häm gebunden, dass die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Hydroxylierung nicht mehr gegeben sind. Vielmehr ist es sogar möglich, dass das Testosteron in seiner Position in der Mutante so weit vom Häm entfernt ist, dass das im Ruhezustand des Enzyms oberhalb des Häm gebundene Wassermolekül seine Position nicht verlassen muss. Damit wird der erste Schritt des Reaktionszyklus der Hydroxylierung durch CYPs nicht ausgelöst und es findet keine Umsetzung des Testosterons statt.

6.13 3D QSAR-Untersuchung

6.13.1 Modellerstellung

Eine wichtige Anwendung für das Modell ergibt sich zum Beispiel bei der Erstellung von strukturbasierten QSAR³⁴-Modellen. Die für QSAR-Methoden wichtige Überlagerung der Substanzen (Pharmakophor-Erstellung) wird hierbei automatisiert und basiert auf dem Docking der Substanzen in das Enzymmodell.

Mit Hilfe des erstellten Modells sollte nun versucht werden, eine von Poso [148] veröffentlichte 3D-QSAR-Analyse mit 28 Inhibitoren der 7-Hydroxylierung von Cumarin nachzuvollziehen. In der Arbeit von Poso wurde eine Überlagerung der in Abbildung 6.44 aufgeführten Inhibitoren von Hand durchgeführt. Die Untersuchung resultierte in einem CoMFA³⁵- und einem GRID/GOLPE-Modell, die die in Tabelle 6.10 aufgelisteten statistischen Eigenschaften aufwiesen.

Tabelle 6.10: Statistische Eigenschaften der im Artikel von Poso [148] aufgestellten Modelle; q^2 = kreuzvalidierter Korrelationskoeffizient; r^2 = Korrelationskoeffizient der Hauptkomponentenanalyse; S_{PRESS} (Sybyl) und SDEP (GOLPE) = Standardfehlerabweichung der Vorhersage; N = Anzahl der Hauptkomponenten.

Modell	q^2	r^2	$S_{\text{PRESS}}/\text{SDEP}$	N
CYP2A5 CoMFA	0,79	0,94	0,66	3
CYP2A5 GOLPE	0,86	0,94	0,48	2

Um nicht alle 28 Inhibitoren von Hand in das aktive Zentrum positionieren zu müssen, wurden die Moleküle mit Hilfe des Programms AutoDock Version 2.4 in das CYP2A5-Wildtyp-Modell flexibel eingedockt. Es wurde hierbei wieder die Modellstruktur nach 1,4 ns freier Dynamik verwendet. Die dabei von den Standardeinstellungen des Programms abweichenden Parameter sind in Tabelle 6.11 aufgeführt (mehr zum Programm AutoDock siehe Kapitel 5.4).

AutoDock generiert mehrere mögliche Konformationen, in denen ein Ligand im aktiven Zentrum gebunden werden kann. Um geeignete Ligandkonformationen für die

³⁴QSAR = Quantitative Structure Activity Relationship

³⁵CoMFA = Comparative Molecular Field Analysis

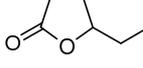
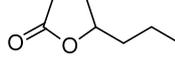
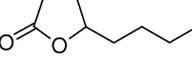
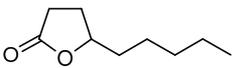
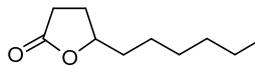
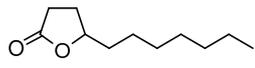
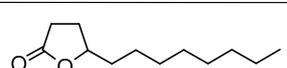
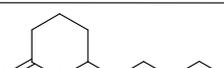
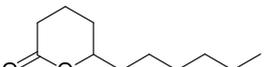
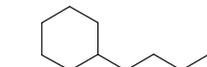
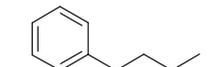
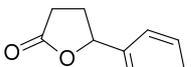
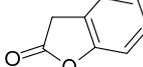
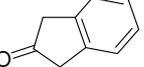
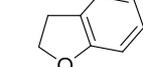
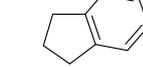
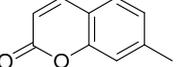
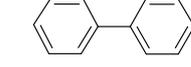
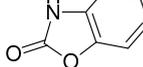
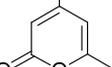
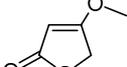
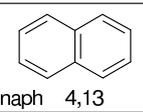
 x1 1,73	 x2 2,01	 x3 3,05
 x4 2,22	 x5 2,28	 x6 2,23
 x7 2,42	 x8 4,54	 x9 5,24
 x10 5,72	 x11 5,68	 x12 5,41
 x13 5,41	 x14 2,66	 x15 5,42
 x16 4,93	 x17 5,24	 x18 4,79
 x19 5,62	 x20 4,33	 x21 4,29
 x22 4,10	 x23 4,08	 x24 5,40
 x26 4,54	 x27 2,98	 x28 3,38
 x29 2,14	 naph 4,13	

Abbildung 6.44: Strukturformeln der bei der QSAR-Untersuchung verwendeten Substanzen mit Angabe ihrer Bezeichnung und Inhibitionskonstanten (pIC_{50}) aus [148]. Die Verbindung naph (Naphthalin) diente nach Erstellung des Modells als Testsubstanz.

Tabelle 6.11: AutoDock-Parameter, die von den Standardeinstellungen abweichen.

Parameter	Wert
Boxgröße	60 : 60 : 50 Gridpunkte
Anzahl der Läufe	50
Anzahl der Zyklen	50
max. Zahl akzeptierter Schritte	3000
max. Zahl abgelehnter Schritte	3000
Toleranzgrenze der RMS-Abweichung	1,0 Å

QSAR-Analyse auswählen zu können, wurden alle Ergebniskonformationen des größten Liganden im Satz (x13) nochmals gemeinsam mit dem Enzym-Modell im Programm PrGen energieminimiert [149, 150]. Die energetisch günstigste Konformation wurde als Orientierungspunkt für die Auswahl der Konformationen der anderen Inhibitoren gewählt. Abbildung 6.45 zeigt alle untersuchten Substanzen in ihrer gedockten Position im Protein.

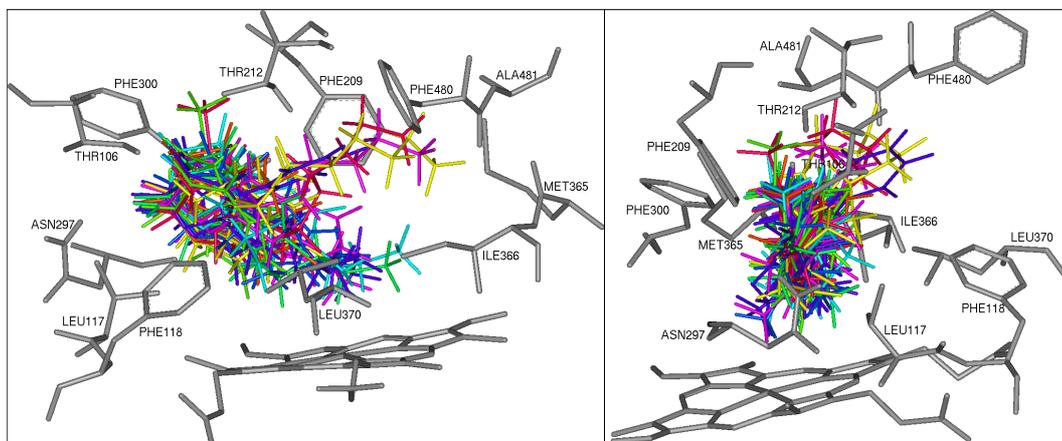


Abbildung 6.45: Mit AutoDock 2.4 gewonnene Positionierung aller 28 Inhibitoren (farbig) im aktiven Zentrum von CYP2A5 (grau). Ansicht parallel zum Häm mit Aufsicht auf die Inhibitoren (links) und nach Drehung um 90° nach rechts (rechts).

Die überlagerten Inhibitoren wurden aus dem Protein entnommen und im Programm GRID wurden Interaktionsfelder mit der N2-Sonde (amidischer Stickstoff mit Wasserstoffen) und der dry-Sonde (”trockenes Wasser”) bei einer Gitterweite von 1,0 Å berechnet. Diese Sonden wurden ausgewählt, weil sie möglichen Wechselwirkungs-

partnern im Enzym am besten entsprechen. Mit der dry-Sonde können hydrophobe Wechselwirkungen bestimmt werden, während die N2-Sonde als Wasserstoffbrücken-Donator fungieren kann. Für genauere Informationen zu den einzelnen Sonden siehe Kapitel 5.5.

Jedem Liganden wurden die von GRID berechneten Werte mit jeder Probe an jedem Gitterpunkt als x-Variablen und die Stärke der Inhibition der Cumarin-7-Hydroxylierung als y-Variable zugeordnet. Dadurch ergaben sich 13719 Variablen pro Ligand, von denen nicht alle an der Erklärung der Unterschiede in der Inhibitionsstärke beteiligt sind. Im Programm GOLPE wurden die aussagekräftigen Variablen herausgefiltert. Die Zahl der x-Variablen wurde über die in Tabelle 6.12 aufgelistete Vorauswahl, eine *smart region definition*, die die Variablen in Gruppen zusammenfasst und das *F-factorial design* (FFD), bei dem die Bedeutung jeder einzelnen Variablen für das Modell getestet wird, von 13718 auf 830 reduziert.

Tabelle 6.12: Variablenreduktion und -wichtung mit GOLPE

ursprüngliche Anzahl x-Variablen		13718
verworfen wurden		(reduziert auf)
Variablen mit Werten nahe Null	(positive: $\leq 0,1$) (negative: $\geq -0,01$)	(6781)
Variablen mit sehr geringer Standardabweichung ($\leq 0,1$)		(2342)
Variablen, die in 2 oder 3 Substanzen einen gleichen Wert annehmen, obwohl die Affinität sich unterscheidet		(2225)
Skalierung der Variablen der beiden Sonden (BUW Scaling ^a)		
OH-Sonde (Faktor)		0.710400
dry-Sonde (Faktor)		7.383609
<i>smart region definition</i>		685 Gruppen kollabieren in 602 (830)
<i>FFD selection</i>		(830)
endgültige Anzahl x-Variablen		830

^a BUW Scaling = Block Unscaled Weights Scaling = Skalierung von Datenblöcken, um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten zu ermöglichen.

Diese Reduktion wird durch die Einteilung der Variablen in Hauptkomponenten (PCA³⁶) und anschließende PLS³⁷-Regressionsanalyse ermöglicht. Bei der PLS-Analyse werden die biologischen Aktivitäten mit den vorhandenen Variablen korreliert und neu vorhergesagt. Der Korrelationskoeffizient r^2 des Modells ohne Berücksichtigung der FFD-Analyse betrug 0,98 mit einem kreuzvalidierten q^2 -Wert von 0,80 und einem SDEP³⁸-Wert von 0,60. Zur Validierung wurde die *Random Groups*-Methode genutzt, die bei der zur Erstellung des aktuellen Modells nur 80 % der Liganden einsetzt und die restlichen 20 % als internen Testset verwendet (s. Kap. 5.5).

Nach Anwendung der FFD-Analyse, bei der sich die Zahl der x-Variablen von 2225 auf 830 reduzierte, zeigte das Modell einen vergleichbaren r^2 -Wert von 0,97, verbesserte sich aber auf einen q^2 -Wert von 0,92 mit einer Fehlerabweichung (SDEP) von 0,38. Bei Erstellung der Modelle wurden jeweils 2 Hauptkomponenten verwendet (s. Abb. 6.46).

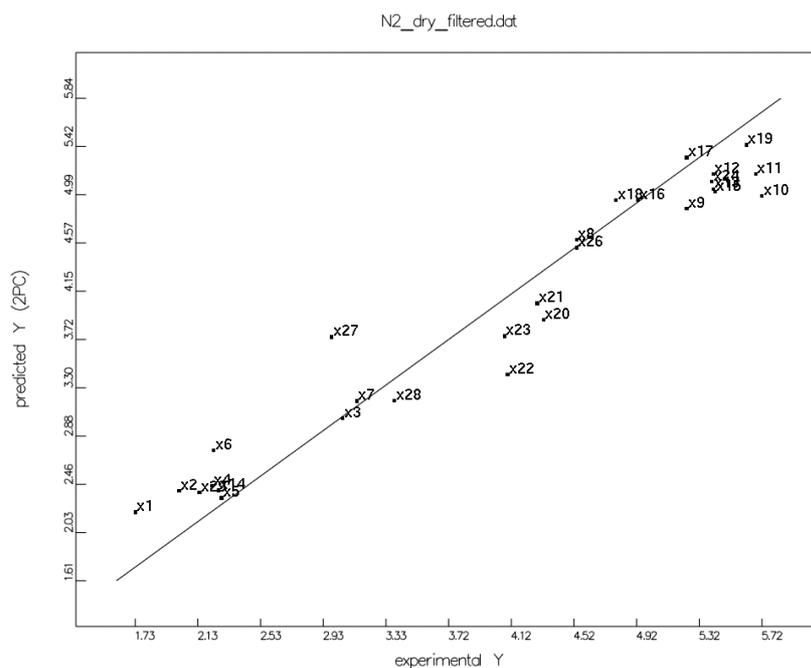


Abbildung 6.46: Kreuzvalidierte Korrelation der experimentellen Inhibitionswerte (pIC_{50}) mit den von GOLPE berechneten Werten.

³⁶PCA = Principal Component Analysis

³⁷PLS = Partial Least Square

³⁸SDEP = Standard Deviation Error of Prediction

6.13.2 Interpretation der Felder

Die unabhängig vom Enzym gewonnen GRID/GOLPE-Ergebnisse konnten wieder ins Enzym übertragen werden und belegen so in einigen Bereichen die Wichtigkeit einzelner Aminosäuren. Die mit GOLPE erhaltenen Felder zeigen die Gridpunkte an, die wichtig sind, um die Unterschiede in der biologischen Aktivität der Inhibitoren zu erklären.

Abbildung 6.47 zeigt die Position der GOLPE-Felder in der Enzymumgebung gemeinsam mit zwei der wirksamsten Inhibitoren des Datensatzes (x11 und x19). Die Felder, die für die Erklärung der Unterschiede wichtig sind, liegen alle innerhalb des aktiven Zentrums und die stärksten Felder lassen sich sogar bestimmten Aminosäuren zuordnen. Dabei bedeuten negative Felder (blau), dass sich eine Wechselwirkung mit der bei der Erstellung des Feldes verwendeten Sonde in diesem Bereich günstig auf die Korrelation auswirkt. Positive Felder (gelb) beeinflussen die Korrelation negativ, wenn eine Interaktion mit einer Sonde des verwendeten Typs in diesem Bereich zustande kommt.

Den negativen Feldern der N2-Sonde lassen sich deutlich wasserstoffbrückendorientierenden Aminosäuren zuordnen. Das stärkste Feld liegt bei der Aminofunktion der Seitenkette von Asparagin 297. Zu dieser Aminosäure bilden mehrere der Inhibitoren eine Wasserstoffbrücke aus. Ein weiteres starkes Feld liegt bei Threonin 106 und kann mit dessen Hydroxyl-Funktion verbunden werden. In der Nähe der Hydroxyl-Gruppe von Threonin 212 liegt ein schwächeres Feld, das für die Erklärung der Wirkunterschiede weniger Bedeutung hat. Das starke positive Feld (gelb) am anderen Ende der Inhibitoren zeigt, dass in dieser Region Wechselwirkungen mit einem Wasserstoffbrücken-Donator für die Korrelation ungünstig sind. Im Protein ist dieser Teil des aktiven Zentrums mit hydrophoben Aminosäuren ausgekleidet (Ile366, Leu370, Phe209), die keine Wasserstoffbrücken-Bindungen eingehen können.

Mit der dry-Sonde erkennt man besonders starke Felder bei der Seitenkette von Leucin 370 und Phenylalanin 209. Hydrophobe Wechselwirkungen in diesen Regionen bewirken eine Verbesserung der Korrelation. Die positiven Felder der dry-Sonde sind schwächer als die anderen Felder und lassen sich nicht einzelnen Aminosäuren zuordnen.

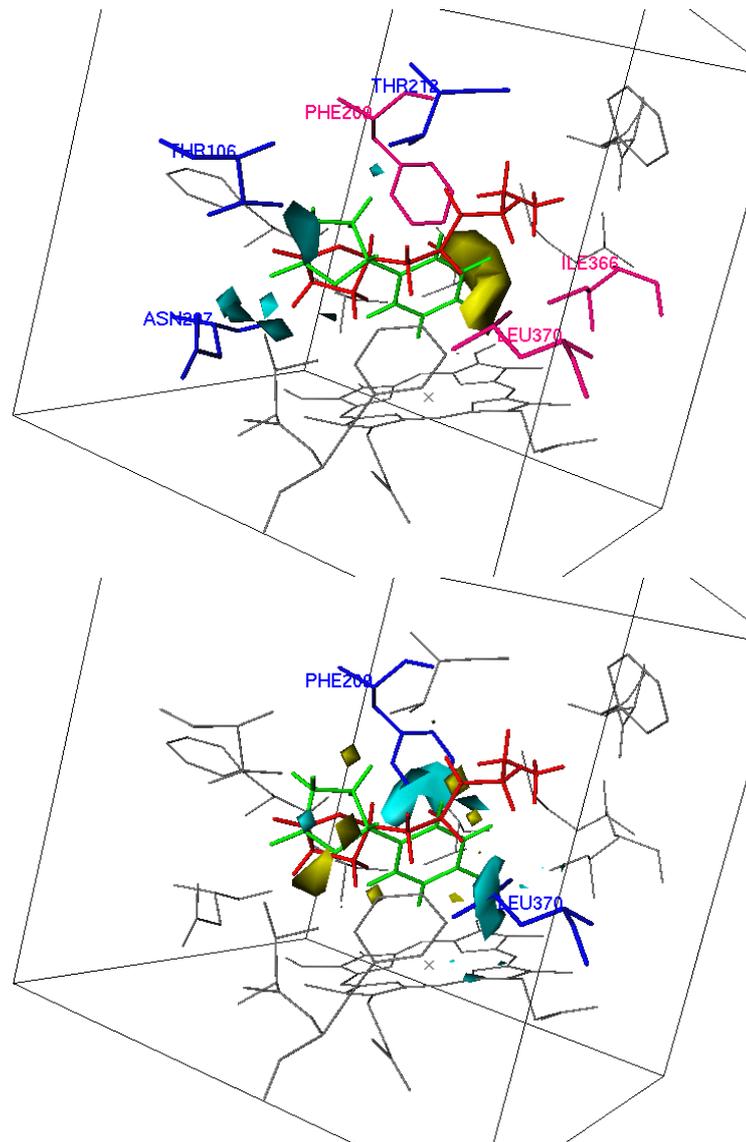


Abbildung 6.47: Abbildung der GOLPE-Felder aus den PLS-Koeffizienten bei zwei Hauptkomponenten im Protein (grau). Aminosäuren, die für die Ausbildung negativer Felder verantwortlich gemacht werden sind blau hervorgehoben. Aminosäuren mit positiven Feldern sind pink eingefärbt. Oben: N2-Sonde, in türkis konturiert das negative Feld bei $-0,0030$ und in gelb das positive Feld bei $+0,0066$; unten: dry-Sonde, negatives Feld bei $-0,0040$ und positives Feld bei $+0,0027$. Dazu zwei potente Inhibitoren x11 (rot) und x19 (grün).

Die GOLPE-Untersuchung zeigt, dass die Aminosäuren Thr106, Phe209, Thr212, Asn297, Ile366 und Leu370 an der Bindung von Substraten beteiligt sind und für die

unterschiedliche Bindungsstärke im aktiven Zentrum Verantwortung tragen. Dies bestätigt die Moleküldynamik-Simulationen mit Corticosteron und Deoxycorticosteron im aktiven Zentrum, bei denen ebenfalls diese Aminosäuren durch Wechselwirkungen mit den Substraten aufgefallen waren (s. Kap. 6.11.1).

6.13.3 Vorhersage

Nach der Erstellung des Modells wurden von Juvonen Inhibitionsdaten für eine weitere Substanz zur Verfügung gestellt [151]. Es handelt sich um Naphthalin (s. Tab. 6.44), das mit einem pIC_{50} -Wert von 4,13 ($IC_{50} = 74 \mu M$) im Bereich mittlerer Aktivität liegt. Obwohl das Modell durch das harte Kriterium der *Random Groups* getestet wurde, war die Vorhersage der Inhibitionsrate des Naphthalins die erste echte Vorhersage mit diesem Modell. Nach dem Docking der Substanz mit AutoDock, der Auswahl der energetisch günstigsten Konformation und Berechnung der GRID-Felder ergab sich mit dem erstellten Modell eine Vorhersage von 3,83. Dies weicht um 0,3 pIC_{50} -Einheiten vom gemessenen Wert ab, ist aber deutlich innerhalb der SDEP-Abweichung und die Vorhersage fügt sich so gut in das Modell ein.

6.14 CYP2A6 (Wildtyp)

6.14.1 Bau und Dynamik

Nach Bau und Absicherung des Modells von CYP2A5 konnte aus diesem Modell ein Modell von CYP2A6 abgeleitet werden. Ausgangspunkt war wiederum die Struktur von CYP2A5 nach 1,4 ns freier Dynamik. In dieser Struktur wurden alle nichtidentischen Seitenketten analog dem Sequenzalignment in Abb. 6.48 ersetzt. Die Größe der Wasserbox des neuen Enzyms wurde vom CYP2A5-Modell übernommen. Da es sich nur bei wenigen der 64 unterschiedlichen Aminosäuren um den Austausch eng verwandter Aminosäuren handelt, und die Größen der Aminosäuren zum Teil stark variieren, wurden die Positionen von Wassermolekülen und Natrium- sowie Hydrogenphosphat-Ionen nicht übernommen, sondern neu bestimmt. Durch dieses Vorgehen konnten viele ungünstige Kontakte der neuen Seitenketten mit Wassermolekülen des CYP2A5-Modells vermieden werden. Dabei musste in Kauf genommen werden, dass Wassermoleküle, die sich während der langen freien Dynamik des CYP2A5-Modells an wichtige Positionen im Protein bewegt hatten, verloren gingen. Um diese zu ersetzen, mussten wieder Dynamiken-Simulationen vergleichbarer Länge durchgeführt werden. Die Moleküldynamik-Rechnungen mit CYP2A6 wurden komplett mit GROMACS 3.0, dem Nachfolger der vorher verwendeten Version 2.0, durchgeführt [152]. GROMACS 3.0 zeichnet sich durch schnellere Rechenalgorithmen und einige weitere Verbesserungen aus, die ebenfalls die Rechengeschwindigkeit erhöhen. Alle Parameter, die zur Durchführung der Simulationen genutzt wurden (Kraftfeld, Cut-Off-Radien, ...), waren allerdings bei allen Simulationen identisch.

Bevor die Wassermoleküle neu in die Box eingefügt werden konnten, mussten ebenso wie beim Bau des CYP2A5-Wildtyps die 20 Hydrogenphosphat-Ionen zufällig in der Box platziert werden. Nach Auffüllen der Box mit Wasser wurden insgesamt 37 Natrium-Ionen ebenfalls zufällig eingesetzt, um die elektronische Neutralität der Box zu gewährleisten. Nach einer Energieminimierung des Gesamtsystems folgte eine Wasserboxäquilibrierung, bei der die Protein-Atome mit einer Kraftkonstante von $1000 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$ auf ihrer Position festgehalten wurden. Das Tethering wurde analog dem Bau der CYP2A5-Variante in 100 ps langen Dynamiken auf 500, 200 und $100 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$ abgesenkt. Das Enzym erhielt so nach und nach mehr Beweglich-

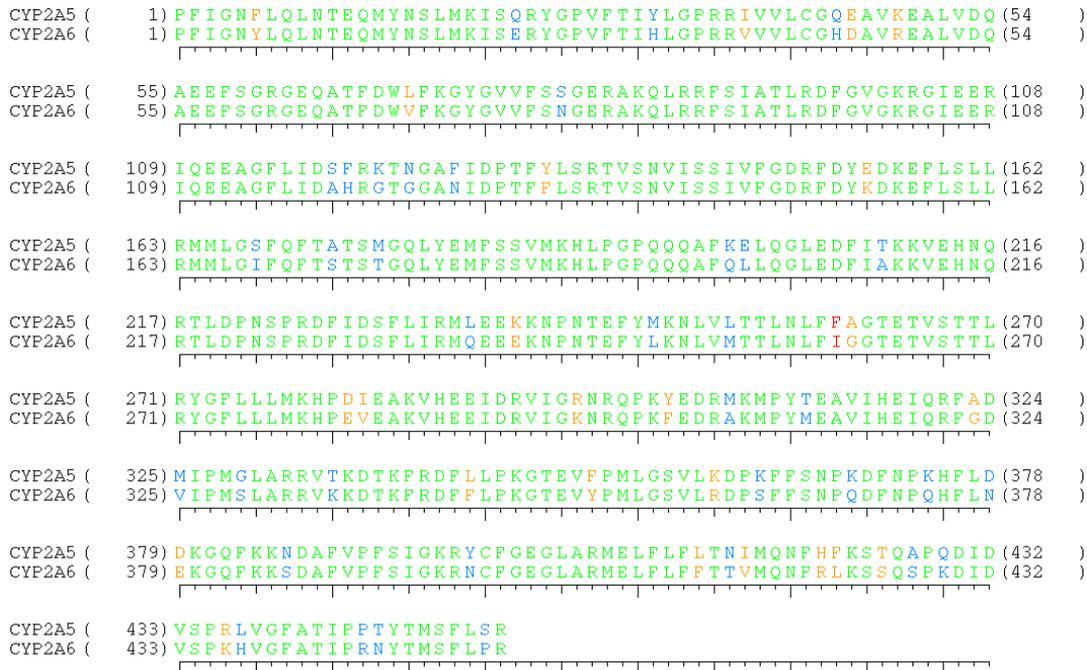


Abbildung 6.48: Alignment der Sequenzen von CYP2A5 und 2A6 (grün: identische Aminosäuren (AS), orange: homologe AS, blau: nichthomologe AS). Rot eingefärbt ist das wichtige Aminosäurepaar in Position 260 (entspricht Position 300 bei Einbeziehung des Membranankers).

keit und konnte sich langsam entspannen. Es folgten auch hier 1500 ps freier Dynamik, von denen die letzten 100 ps als Sammelzeitraum für Proteinkonformationen genutzt wurden. Aus den gesammelten Konformationen wurde eine repräsentative ausgewählt und in einen Vergleich mit CYP2A5 eingebracht.

6.14.2 Kontrolle des Modells

Das Modell von CYP2A6 zeigte eine Absenkung der potentiellen Energie in Stufen parallel zur Absenkung der Rückhaltekraft. In der freien Dynamik wurde schon nach ca. 100 ps eine Äquilibration der Energie-Werte beobachtet (s. Abb. 6.49).

Die Bewegungen des Proteins verstärkten sich während der Absenkung der Rückhaltekräfte stufenartig und erreichten nach etwa 350 ps freier Dynamik ein erstes Plateau, das sich nochmal erhöhte, und nach ca. 1100 ps freier Dynamik (1500 ps Gesamtdynamik) auf ein gleichbleibendes Niveau von ungefähr 0,21 nm einpendelte. Dies

entspricht dem Niveau, das auch bei den Dynamiken mit den CYP2A5-Mutanten erreicht wurde.

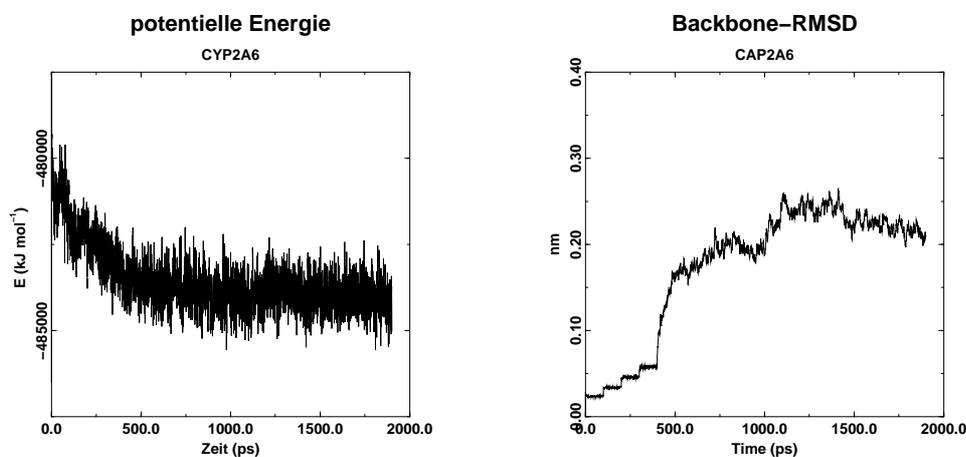


Abbildung 6.49: Verlauf der Potentialkurve (links) und des RMSD-Wertes für die Abweichungen des Proteinerückgrats (rechts) während der Dynamik des CYP2A6-Wildtyps.

Diese Ergebnisse zeigen kein ungewöhnliches Verhalten auf. Die Moleküldynamik des CYP2A6 lief vergleichbar mit den zu Beginn dieser Arbeit vorgestellten Modellen von CYP2A5 und seinen Mutanten.

Die Gesamtgeometrie des Proteins wurde wieder mittels PROCHECK getestet. Die aus den letzten 100 ps der freien Dynamik gewonnen Proteinstrukturen wurden für 100 Schritte nach der Steepest-descent-Methode minimiert und mittels PROCHECK auf ihre Qualität überprüft. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 6.13 zu sehen.

Die Aminosäureverteilung im Ramachandran-Plot ist der in den anderen Modellen und in den dynamisch gerechneten Kristallstrukturen vergleichbar. Der zusammenfassende G-Faktor, der für Strukturen guter Qualität über -0,5 liegen sollte, ist mit Werten zwischen -0,22 und -0,30 etwas niedriger als bei den anderen Modellen, aber noch deutlich oberhalb des angegebenen Grenzwertes. Die erhaltenen Werte sind vergleichbar mit denen aus der CYP2A5-Wildtyp. Es handelt sich somit bei CYP2A6 um ein Modell ausreichender Güte. Für die weiteren Vergleiche der Strukturen von CYP2A5

Tabelle 6.13: Ergebnisse der PROCHECK-Untersuchungen an 11 Frames aus den letzten 100 ps der freien Dynamik von CYP2A6 (Wildtyp)

Frame	Anteil Aminosäuren in den Bereichen (in %)				ungünstige Kontakte	gesamt G-Faktor
	favorisiert	günstig	weniger günstig	ungünstig		
1800 ps	80,9	15,9	2,5	0,8	0	-0,27
1810 ps	81,9	15,1	1,0	2,0	0	-0,22
1820 ps	80,6	16,1	1,8	1,5	0	-0,24
1830 ps	77,1	19,6	1,3	2,0	0	-0,29
1840 ps	77,3	19,1	1,8	1,8	1	-0,28
1850 ps	79,8	16,9	2,0	1,3	0	-0,28
1860 ps	76,1	19,9	2,3	1,8	0	-0,30
1870 ps	80,1	16,1	2,3	1,5	2	-0,26
1880 ps	78,6	17,9	2,0	1,5	0	-0,29
1890 ps	79,3	17,9	1,0	1,8	1	-0,26
1900 ps	79,1	17,1	2,5	1,3	0	-0,26

und CYP2A6 wurde die Struktur nach 1800 ps Gesamtdynamik ausgewählt. Sie zeichnete sich durch die geringste Anzahl an Aminosäuren im ungünstigen Bereich aus. Den Ramachandran-Plot dieses Frames zeigt Abbildung 6.50. Die drei Aminosäuren im ungünstigen Bereich sind identisch mit denen aus der CYP2A5-Struktur. Die ungünstigen Geometrien treten im Bereich eines engen Turns auf, der zwei benachbarte Faltblatt-Stränge verbindet. Im Vergleich zu CYP2A5 war bei diesen drei Aminosäuren eine Substitution in Position 110 von Leucin zu Valin finden, dessen Eigenschaften denen des Leucin entsprechen, so dass keine Änderung im Verhalten im Ramachandran-Plot zu erwarten war.

Alle anderen Strukturmerkmale, die für Cytochrome P450 wichtig sind, waren auch in der Struktur von CYP2A6 vorhanden. Die Qualität der Gesamtstruktur des CYP2A6-Modells ist mit der des CYP2A5-Modells vergleichbar. Nachfolgend wurden die Unterschiede der Strukturen im aktiven Zentrum genauer untersucht.

6.15 CYP2A5 - CYP2A6 – Ein Vergleich

Auf Grund der weit gehenden Identität der beiden Enzyme CYP2A5 und CYP2A6 sind auch die aktiven Zentren fast identisch aufgebaut. Auch die Substratspezifitäten

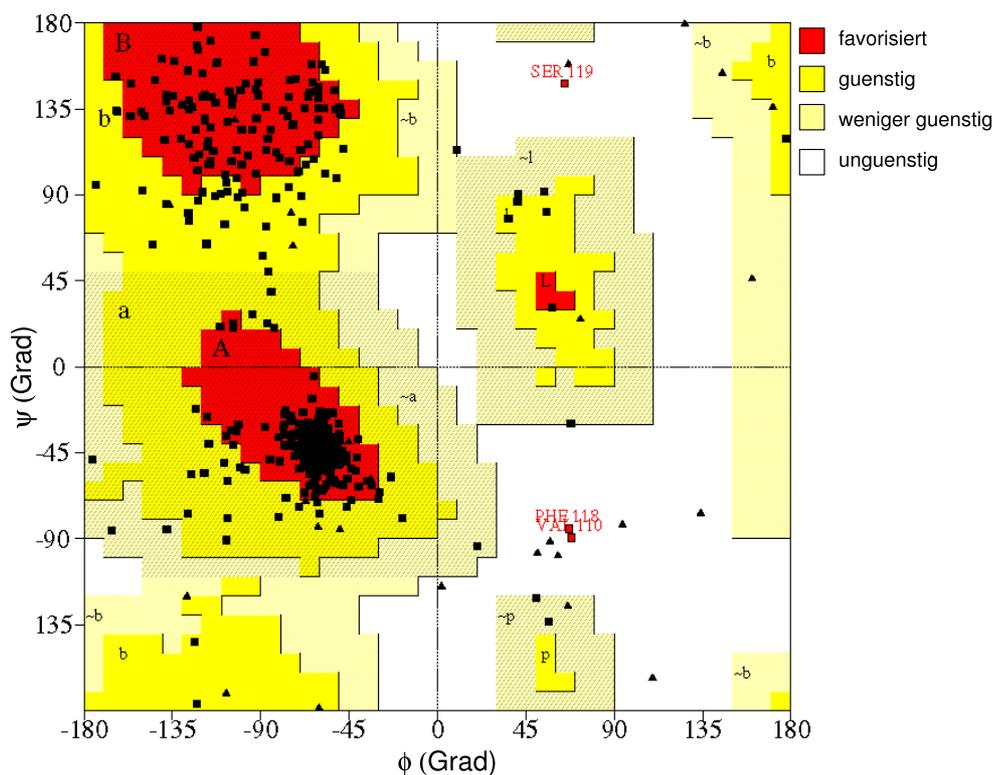


Abbildung 6.50: Ramachandran-Plot des CYP2A6-Modells nach 1800 ps Gesamtdynamik.

der beiden Enzyme sind ähnlich. Trotzdem gibt es einige Unterschiede [105, 148], die hier durch einen genauen Vergleich der aktiven Zentren der Strukturen erklärt werden sollen.

Der Vergleich zeigt auf, dass im Bereich des aktiven Zentrums der beiden Cytochrome nur drei Aminosäuren unterschiedlich sind. Es handelt sich um Phe300 \triangleright Ile, Ala301 \triangleright Gly und Met365 \triangleright Val (jeweils Bezeichnung in CYP2A5 \triangleright CYP2A6). Für die Erklärung der Unterschiede zwischen CYP2A5 und CYP2A6 ist besonders die Mutation in Position 300 wichtig. Hier wurde ein Phenylalanin gegen ein Isoleucin ausgetauscht (s. Abb. 6.48). Abbildung 6.51 zeigt die aktiven Zentren der beiden Enzyme und man erkennt, dass das Raumsegment, das in CYP2A5 von der Phenylalanin-Seitenkette eingenommen wird, bei der CYP2A6-Struktur vom Methyl-Rest der Isoleucin-Seitenkette beansprucht wird. Der Ethyl-Rest der Isoleucin-Seitenkette ragt ins aktive Zentrum hinein. Dadurch wird Asn 297, das sich in den CYP2A5-Dynamiken und in der GRID/GOLPE-Untersuchung als wichtiger Bindungspartner für die Substrate

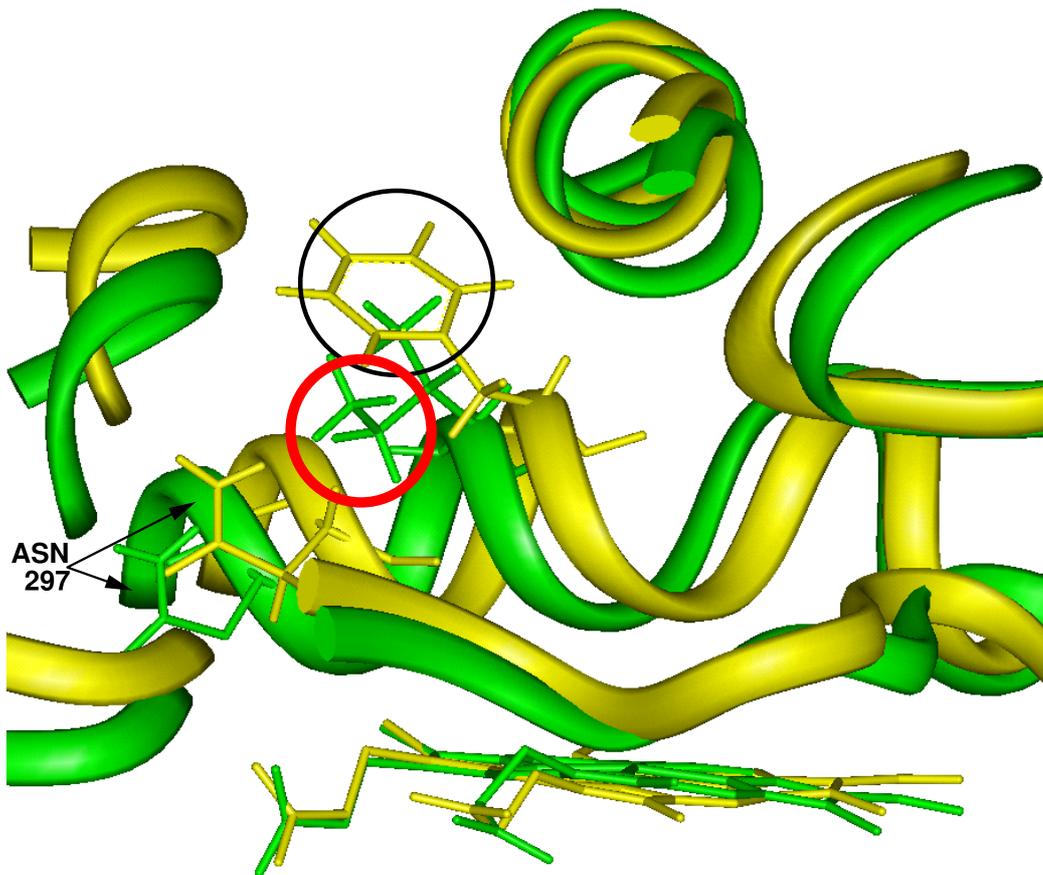


Abbildung 6.51: Blick ins aktive Zentrum von CYP2A5 (gelb) und CYP2A6 (grün). Der Methyl-Rest der Seitenkette von Ile300 bei CYP2A6 liegt im gleichen Raumsegment wie die Seitenkette von Phe300 in CYP2A5 (schwarzer Kreis). Der Ethyl-Rest der Ile300-Seitenkette ragt ins aktive Zentrum (roter Kreis) und drängt die Seitenkette von Asn297 nach außen.

herausgestellt hatte, nach außen gedrängt und die Seitenkette des Isoleucins blockiert den Zugang zu Asn 297 (s. Abb 6.52).

Durch die Substitution von Phenylalanin 300 mit Isoleucin in CYP2A6 wird eine bei CYP2A5 wichtige Interaktionsmöglichkeit für Substrate blockiert. Das aktive Zentrum wird auf dieser Seite durch die Seitenkette von Ile300 verkleinert und Substrate von CYP2A6 müssen sich anders orientieren.

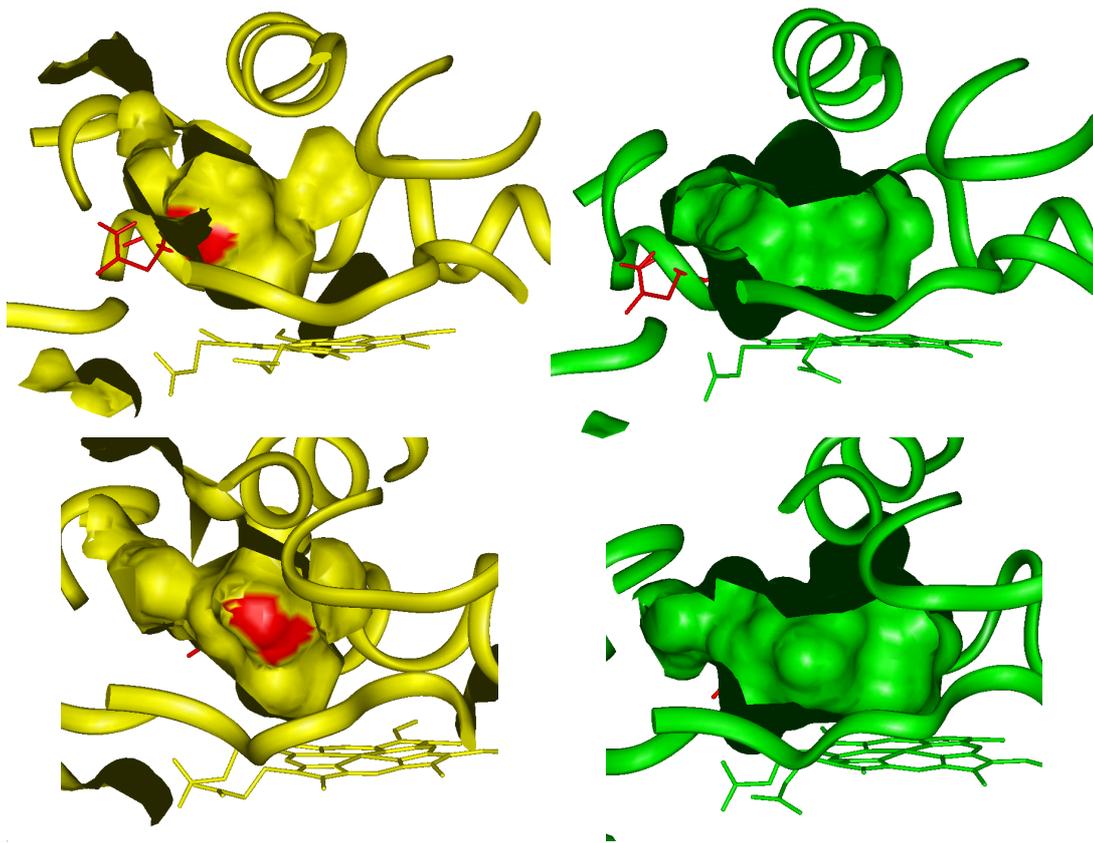


Abbildung 6.52: Blick ins aktive Zentrum von CYP2A5 (gelb) und CYP2A6 (grün). Oben: Berechnung der zugänglichen Oberfläche (Connolly-surface; Probenradius: 1,4 Å) von Asn297 (rot) und den umgebenden Aminosäuren. Der Oberflächenanteil von Asn297 ist rot eingefärbt. Unten: gedrehte Ansicht mit direkter Aufsicht auf Asn297. Bei CYP2A6 hat Asn297 keinen Anteil mehr am aktiven Zentrum.

Kapitel 7

Diskussion

Cytochrome P450 kommen in quasi allen lebenden Organismen vor. Sie spielen dort eine entscheidende Rolle bei der Synthese und der Verstoffwechslung wichtiger körpereigener sowie körperfremder Substanzen. Cytochrome, die an Synthesen beteiligt sind, sind hochspezialisierte und hochselektive Enzyme. Metabolisch wirksame Cytochrome sind hingegen wenig selektiv und daher in der Lage eine große Anzahl verschiedener Substrate umzusetzen. Die Umsetzung der Substrate dient meist dazu, die Substanzen hydrophiler werden zu lassen und damit deren Ausscheidung zu beschleunigen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Cytochrome zählen zu den metabolisch wirksamen Enzymen, für die bisher noch kein endogenes Substrat bekannt ist. Sie dienen anscheinend nur dazu, Xenobiotika, die zum Beispiel mit der Nahrung in den Körper gelangen, ausscheidbar zu machen. Auch die in der Medizin verwendeten Arzneistoffe werden als Xenobiotika von Cytochromen verstoffwechselt. Dabei kann die Enzymausstattung mit Cytochromen P450 von Individuum zu Individuum unterschiedlich sein. Durch die Kenntnis des dreidimensionalen Aufbaus der verschiedenen Cytochrome lassen sich die Auswirkungen von genetischen Unterschieden in der Enzymausstattung schon vor der ersten Gabe eines Arzneistoffes abschätzen.

Durch die Erstellung von Modellen kann der schwierigen Kristallisation der Enzyme vorgegriffen werden, aber Modelle sind nur so gut, wie die ihnen zugrunde liegenden experimentellen Daten. Erst wenn ein Modell nachgewiesen hat, dass es in der

Lage ist experimentelle Befunde zu erklären und es so seine Zuverlässigkeit bewiesen hat, kann man es wagen, mit diesem Modell Vorhersagen auf noch unbekannte Zusammenhänge anzustellen.

Bei der Modellerstellung müssen verschiedene Extrapolationen und Annahmen getroffen werden. Das Ausmaß dieser Annahmen beeinflusst die Güte des Ergebnisses erheblich. Bei der verwendeten Methode des Molecular Modelling liegt das größte Problem in der Auswahl eines möglichst guten Templats, auf dem der Modellaufbau beruht. Der Ähnlichkeit der Sequenzen, auf der die räumliche Ähnlichkeit der Strukturen beruht, muss größte Aufmerksamkeit geschenkt werden. Homologie-Modelle, die auf weniger als 25 % Sequenzähnlichkeit beruhen, sind nur in Ausnahmefällen als nahe an der Wirklichkeit zu betrachten. Cytochrome P450 gehören zu diesen Ausnahmen. Sie weisen trotz ihrer geringen Sequenzidentität eine gemeinsame räumliche Faltung auf, so dass hier auch bei geringen Sequenzidentitäten ein erfolgreicher Modellbau durchgeführt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte auf die Sequenz eines Cytochroms P450 aus dem Kaminchen zurückgegriffen werden. Die Sequenzidentität zwischen diesem CYP und den Modellsequenzen liegt bei etwa 50 %. Bei einer solch hohen Sequenzidentität ist die Wahrscheinlichkeit für die Erstellung eines stabilen und wirklichkeitsnahen Modells sehr hoch.

Um die Stabilität des Modells zu prüfen, wurde es in eine Wasserbox gebettet und dort mittels Moleküldynamik-Simulationen untersucht. Durch die Verwendung der Wasserbox und die Einbeziehung von Ionen konnte bei den Simulationen auf die Verwendung von Rückhaltekräften verzichtet werden. Diese Kräfte müssen bei Dynamiksimulationen oft benutzt werden, um ein Aufbrechen des Modells zu verhindern. Der Einsatz solcher Kräfte sollte bei jeder Dynamik-Simulation weitgehend minimiert oder ganz vermieden werden, weil er immer große Restriktionen für die Beweglichkeit der Gesamtstruktur beinhaltet.

Bei Verwendung der Dynamiksimulation muss großes Augenmerk auf die Methoden gelegt werden, die zur Berechnung der van-der-Waals- und elektrostatischen Wechselwirkungen benutzt werden. Insbesondere der Radius innerhalb dessen Wechselwirkungen noch in vollem Umfang berechnet werden ist von größter Bedeutung. Der Radius muss groß genug sein, um alle wichtigen Wechselwirkungen zu erfassen.

sen, aber klein genug, um mit der vorhandenen Rechnerleistung ausreichend lange Simulationszeiten zu erlauben. Die ausreichende Länge der Radian während der Dynamiksimulationen konnte durch die Stabilität der Modelle belegt werden. Außerdem wurden neben den schon in der Templatstruktur vorhandenen Sekundärstrukturelementen noch weitere Elemente ausgebildet, deren Vorhandensein auf Grund anderer Cytochrom-Kristallstrukturen zu vermuten war. Vergleichsrechnungen mit größerem elektrostatischen Radius brachten keine qualitativen Veränderungen der Ergebnisse.

Ein wichtiger Punkt für die Beurteilung einer Methode der Proteinsimulation ist der Ramachandran-Plot, in dem die Geometrie der Proteinrückgrates mit der Geometrie von hunderten von Proteinkristallstrukturen verglichen wird. Mit der verwendeten Methode sind die Ergebnisse für den Ramachandran-Plot immer schlechter, als bei Kristallstrukturen, die, abhängig von der Auflösung bei der Datenaufzeichnung, gerade im Bereich des Backbones stark computeroptimierte, idealisierte Geometrien aufweisen. Die Kraftfelder, die bei der Dynamiksimulation verwendet werden, sind in diesem Punkt etwas großzügiger, um eine Bewegung der Strukturen zuzulassen. In manchen Fällen wie bei der Simulation der CYP2C5-Kristallstruktur kann eine Moleküldynamiksimulation sogar zu Verbesserung der Geometrie beitragen.

Die verwendeten Methoden zur Dynamiksimulation waren somit geeignet die 3D-Modelle der Enzyme zu untersuchen. Es konnte sogar nur durch diese Vorgehensweise eine Theorie von Schlichting und Poulos untermauert werden, die der Erweiterung der I-Helix in Cytochromen P450 eine Bedeutung für die Bindung eines Wassermoleküls zuschreibt [21,153]. Dieses Wassermolekül fungiert als letztes Glied in einer Kette von Wassermolekülen und liefert Protonen ins aktive Zentrum, die dort zur Umsetzung der Substrate benötigt werden.

Um zu prüfen ob das Modell wirklichkeitsnah ist, wurden aus dem zuerst gebauten CYP2A5-Modell mehrere Modelle abgeleitet, die das experimentell gefundene Verhalten von zwei Substraten erklären sollten. Mit den gefundenen Unterschieden in den Dynamiken konnten Kriterien festgelegt werden, die nachfolgend dazu dienen können die Umsetzungsrate von Arzneistoffen und anderen Xenobiotika in Cytochromen vorherzusagen.

In einer Anwendung des Modells bei einer QSAR-Untersuchung an CYP2A5-Inhibitoren konnte mit Hilfe des Modells eine deutliche Verbesserung der Aussagekraft

des QSAR-Modells gegenüber einer Untersuchung ohne die Verwendung des Modells erreicht werden. Nach Wiedereinbringung der ausgewerteten Überlagerung in das aktive Zentrum des Proteins, konnten durch die Interpretation der im QSAR-Modell gewonnenen Felder günstiger und ungünstiger Wechselwirkungsbereiche, Aminosäuren festgelegt werden deren Eigenschaften entscheidenden Einfluß auf die Inhibitionsstärke der Substanzen haben. Zu den in dieser Untersuchung erkannten wichtigen Aminosäuren gehört Phe209, das auch schon bei den vorgestellten Protein-Modellen als wichtige Aminosäure aufgefallen ist, weil es die Größe und die Eigenschaften des aktiven Zentrums stark mitbestimmt. Beide Untersuchungsansätze liefern somit übereinstimmende Ergebnisse. Das QSAR-Modell brachte neue Ideen zur Mutation von Aminosäuren, die bei bisherigen Mutationsstudien an CYP2A5 nicht berücksichtigt wurden. So könnte das CYP2A5-Modell weiter überprüft und verbessert werden.

Durch die Ableitung eines stabilen Enzym-Modells aus dem abgesicherten Modell von CYP2A5 wurde die Möglichkeit eröffnet, in Zukunft Modelle einer kompletten Enzym-Unterfamilie aufzustellen. Des weiteren erscheint es möglich, nach Aufklärung einiger weiterer Cytochrome verschiedener Familien, eine komplette Modellbibliothek von Cytochromen unterschiedlicher Spezies zu erarbeiten und diese zu vergleichen.

Die Arbeiten, die auf den erstellten Modellen aufbauen können sind vielfältig. So können nach den hier vorgestellten Methoden Modelle von weiteren humanen Cytochromen P450 aufgebaut werden, um damit die bei der Metabolisierung ablaufenden Prozesse besser zu verstehen. Damit wäre ein erster Schritt hin zu einer individualisierten Therapie gegangen, bei der die individuelle Zusammensetzung der metabolisierenden Proteine der Patienten beachtet wird, um unerwünschte Wirkungen, Akkumulation und zu schnelle Ausscheidung schon bei der Verschreibung von Arzneistoffen auszuschließen.

Es können nun auch im direkten Vergleich der Cytochrom-Strukturen Erklärungen gesucht und Voraussagen getroffen werden über die unterschiedlichen Umsetzungsarten und -positionen bei Enzymen von Maus (CYP2A5) und Mensch (CYP2A6). Durch die Kenntnis der aktiven Zentren kann eine gezielte Entwicklung von Inhibitoren gestartet werden, die auf ein spezielles Cytochrom P450 zugeschnitten sind.

Zur Erweiterung des Datensatzes bei der QSAR-Untersuchung kann versucht werden auch Liganden miteinzubeziehen, die zu groß für ein klassisches Docking sind, weil sie in die gegebene Proteinstruktur mit der fixen Größe des aktiven Zentrums nicht hineinpassen (z. B. Corticosteron). Eine Lösung dieses Problems könnte in einer kurzen Moleküldynamik-Simulation liegen in der sich die Protein-Strukturen schnell an die Größe des Substrats anpassen. Das würde zwar einerseits den Aufwand der Modellgenerierung erhöhen, andererseits aber die Möglichkeit bieten ein komplettes Modell für möglichst viele Substrate und Inhibitoren zu erhalten.

Kapitel 8

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Cytochrome P450 2A5 und 2A6 mit Hilfe von Molecular Modelling Methoden untersucht. Die Enzyme sind hochhomolog (Sequenzidentität: 87 %) und verfügen über ein sehr ähnliches Substratspektrum. Ziel war es die bekannten Unterschiede in der Substratspezifität auf Differenzen im Aufbau der aktiven Zentren zurückzuführen und so eine Vorhersage von Unterschieden bei der Verstoffwechselung von Substanzen zu ermöglichen.

Auf Grund der besseren Datenlage wurde zunächst das Modell von CYP2A5 nach der Methode der Homologie-Modellierung erstellt. Als Vorbild diente die Kristallstruktur von CYP2C5, einem Cytochrom P450 der gleichen Familie. Das Modell erwies sich auch nach längeren Simulationen in einer Wasserbox als stabil. Zur Absicherung des Modells wurde das Verhalten verschiedener Substrate im aktiven Zentrum des Wildtyps und weiterer Punktmutanten von CYP2A5 in Moleküldynamik-Simulationen untersucht. Bei den Dynamiken konnten mehrere Hypothesen zum Umsetzungsmechanismus bei Cytochromen P450 bestätigt werden. Es wurden Kriterien festgelegt, die während der Dynamiken für eine erfolgreiche Umsetzung der Substrate erfüllt sein müssen.

Das auffällige Verhalten einer weiteren Punktmutante gegenüber Testosteron konnte in dynamischen Rechnungen auf eine Vergrößerung des aktiven Zentrums zurückgeführt werden.

Für eine, mit Hilfe des CYP2A5-Modells erstellte, Überlagerung von 28 Inhibitoren wurde ein 3D-QSAR-Modell berechnet, das mit einem kreuzvalidierten Korrelationskoeffizient von 0,92 ein gutes Ergebnis lieferte. Die Berechnung der Inhibitionsstärke einer weiteren Verbindung stimmte gut mit den experimentellen Ergebnissen überein.

Aus dem CYP2A5-Modell konnte anschließend ein Modell von CYP2A6 abgeleitet werden. Auch dieses Modell war in längeren Simulationen stabil. Beim Vergleich der aktiven Zentren der Enzyme zeigte sich, dass durch Mutation einer Aminosäure im aktiven Zentrum die Wechselwirkungsmöglichkeiten mit einer benachbarten Aminosäure blockiert werden. Diese Aminosäure ist bei CYP2A5 als wichtiger Bindungspartner erkannt worden und steht in CYP2A6 nicht mehr zur Verfügung.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Bairoch and R. Apweiler. The swiss-prot protein sequence database and its supplement trembl in 2000. *Nucleic Acids Res.*, 28:45–48, 2000.
- [2] D.R. Nelson and H.W. Strobel. Evolution of cytochrome P-450 proteins. *Mol. Biol. Evol.*, 4:572–93, 1987.
- [3] D. Garfinkel. Studies on pig liver microsomes: 1. Enzymatic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 77:493–509, 1958.
- [4] T. Omura and R. Sato. A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 237:PC1375–PC1376, 1962.
- [5] K. Hofmann, P. Bucher, L. Falquet, and A. Bairoch. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Research*, 27:215–219, 1999.
- [6] D.W. Nebert and F.J. Gonzalez. P450 genes: Structure, evolution and regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, 56:945–993, 1987.
- [7] D.R. Nelson. Cytochrome p450 gene superfamily web site. url: <http://drnelson.utmem.edu/famcount.html>, August 31st, 2001.
- [8] F. Guengerich. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 14:611–650, 2001.
- [9] P. Honkakoski and M. Negishi. The structure, function and regulation of cytochrome P450 2A enzymes. *Drug Metab. Rev.*, 29(4):977–996, 1997.
- [10] D.F.V. Lewis and P. Hlavica. Interactions between redox partners in various cytochrome P450 systems: functional and structural aspects. *Biochim. Biophys. Acta*, 1460:353–374, 2000.
- [11] P.P. Tamburini and G.G. Gibson. Thermodynamics studies of the protein-protein interactions between cytochrome p450 and cytochrome b₅. *J. Biol. Chem.*, 258:13444–13452, 1983.

- [12] P.P. Tamburini, G.G. Gibson, W.L. Backes, S.G. Sligar, and J. B. Schenkman. Reduction kinetics of purified rat liver cytochrome p450. evidence for a sequential reaction mechanism dependent on the hemoprotein spin state. *Biochemistry*, 23:4526–4533, 1984.
- [13] G.G. Gibson and P.P. Tamburini. Cytochrome p450 spin-state: inorganic biochemistry of heme iron ligation and functional significance. *Xenobiotica*, 14:27–47, 1984.
- [14] M. Wang, D.L. Roberts, R. Paschke, T.M. Shea, B.S. Siler Masters, and J.P. Kim. Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD containing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:8411–8416, 1992.
- [15] S. Ding, B.G. Lake, T. Friedberg, and C.R. Wolf. Expression and alternative splicing of cytochrome p-450 cyp2a7. *Biochem. J.*, 306:161–166, 1995.
- [16] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, and P.E. Bourne. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.*, 28:235–242, 2000.
- [17] P. Williams, J. Cosme, V. Sridhar, E. Johnson, and D. McRee. Mammalian microsomal cytochrome p450 monooxygenase: Structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Molecular Cell*, 5:121–131, 2000.
- [18] F. De Rienzo, F. Fanelli, C. Menziani, and P. De Benedetti. Theoretical investigation of substrate specificity for cytochromes P450 IA2, P450 IID6, P450 IIIA4. *J. Comp. Aid. Mol. Design*, 14:93–116, 2000.
- [19] O. Gotoh. Substrate recognition sites in cytochrome p450 family 2 (cyp2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.*, 267:83–90, 1997.
- [20] C. Hasemann, R. Kurumbali, S. Boddupalli, J. Peterson, and J. Deisenhofer. Structure and function of cytochrome P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure*, 3:41–62, 1995.
- [21] I. Schlichting, J. Berendzen, K. Chu, A.M. Stock, S.A. Maves, D.E. Benson, R.M. Sweet, D. Ringe, G.A. Petsko, and S.G. Sligar. The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Science*, 287:1615–1622, 2000.
- [22] F.J. Gonzalez. Human cytochromes p450: problems and prospects. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13:346–352, 1992.
- [23] F.P. Guengerich. Human cytochrome p450 enzymes. In P.R. Ortiz de Montelano, editor, *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, pages 473–536, New York, 1995. Plenum.

- [24] S.A. Wrighton and J.C. Stevens. The human hepatic cytochromes p450 involved in drug metabolism. *Critic. Rev. Toxicol.*, 22:1–21, 1992.
- [25] J. Hakkola, H. Raunio, R. Purkunen, O. Pelkonen, S. Saarikoski, T. Cresteil, and M. Pasanen. Detection of cytochrome p450 gene expression in human placenta in first trimester of pregnancy. *Biochem. Pharmacol.*, 52:379–383, 1996.
- [26] T. Aoyama, S. Yamano, P.S. Guzelian, H.V. Gelboin, and F.J. Gonzalez. Five of 12 forms of vacinia virus-expressed human hepatic cytochrome p450 metabolically activate aflatoxin b₁. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:4790–4793, 1990.
- [27] F.P. Guengerich. Bioactivation and detoxication of toxic and carcinogenic chemicals. *Drug Metabol. Dispos.*, 21:1–6, 1993.
- [28] J.C. Kolars, P. Schmiedlin-Ren, J.D. Schuetz, C. Fang, S.A. Wrighton, R.M. Merion, and P.B. Watkins. Identification of rifampicin-inducible p450iiiA4 (cyp3A4) in human small bowel enterocytes. *J. Clin. Invest.*, 90:1871–1878, 1992.
- [29] M. Shou, J. Grogan, J.A. Mancewicz, K.W. Krausz, F.J. Gonzalez, H.V. Gelboin, and K.R. Korzewka. Activation of CYP3A4: Evidence for the simultaneous binding of two substrates in a cytochrome P450 active site. *Biochemistry*, 33:6450–6455, 1994.
- [30] G.R. Harlow and J.R. Halpert. Analysis of human cytochrome P450 3A4 cooperativity: Construction and characterization of a site-directed mutant that displays hyperbolic steroid hydroxylation kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:6636–6641, 1998.
- [31] L. Xue, H.F. Wang, Q. Wang, G.D. Sklarz, T.L. Domanski, J.R. Halpert, and M.A. Correia. Influence of p4503A4 rsr-2 residues on cooperativity and/or regioselectivity of aflatoxin b₁ oxidation. *Chem. Res. Toxicol.*, 14:483–491, 2001.
- [32] J. Cupp-Vickery, R. Anderson, and Z. Hatziris. Crystal structures of ligand complexes of P450eryF exhibiting homotropic cooperativity. *PNAS*, 97:3050–3055, 2000.
- [33] S. Cholerton, A.K. Daly, and J.R. Idle. The role of individual cytochromes p450 in drug metabolism and clinic response. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13:434–439, 1992.
- [34] A. Mahgoub, J.R. Idle, L.G. Dring, R. Lancaster, and R.L. Smith. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *The Lancet*, pages 584–586, 1977.

- [35] P. Glue and R.P. Clement. Cytochrome p450 enzymes and drug metabolism—basic concepts and methods of assessment. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 19:309–323, 1999.
- [36] M. Heim and U. Meyer. Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific pcr amplification. *The Lancet*, 336:529–532, 1990.
- [37] L.W. Wormhoudt, J. Commandeur, and N. Vermeulen. Genetic polymorphism of human n-acetyltransferase, cytochrome p450, glutathione-s-transferase and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 29:59–124, 1999.
- [38] J.A.G. Agundez, M.C. Ledesma, J.M. Ladero, and J. Benitez. Prevalence of cyp2d6 gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a white population. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 57:265–269, 1995.
- [39] L. Bertilsson, M.-L. Dahl, F. Sjoqvist, A. Aberg-Wistedt, M. Humble, I. Johansson, E. Lundqvist, and M. Ingelman-Sundberg. Molecular basis for rational megaprescribing in ultrarapid hydroxylators of debrisoquine. *Lancet*, 341:63, 1993.
- [40] D.F.V. Lewis. *Cytochromes P450 - Structure, Function and Mechanism*. Taylor & Francis Ltd., 1. Aufl. edition, 1996.
- [41] U.A. Meyer and U.M. Zanger. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37:269–296, 1997.
- [42] D.J. Birkett, D Rees, T. Andersson, F.J. Gonzalez, J.O. Miners, and M.E. Veronese. In vitro proguanil activation to cycloguanil by human liver microsomes is mediated by cyp3a isoforms as well as by s-mephenytoin hydroxylase. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 37:413–420, 1994.
- [43] G. Alvan, P. Bechtel, L. Iselius, and U. Gundert-Remy. The hydroxylation polymorphisms of debrisoquine and mephenytoin in european populations. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 39:533–537, 1990.
- [44] P.J. Wedlund, W.S. Aslanian, C.B. McAllister, G.R. Wilkinson, and R.A. Branch. Mephenytoin hydroxylation deficiency in caucasians: frequency of a new oxidative drug metabolism polymorphism. *Clin. Pharm. Ther.*, 36:773–780, 1984.
- [45] M. Ingelman-Sundberg, M. Oscarson, and R.A. McLellan. Polymorphic human cytochrome p450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20:342–349, 1999.

- [46] T. Chau, S. Muramaki, B. Kawai, K. Nasu, T. Kubota, and A. Ohnishi. Genotype analysis of the *cyp2c19* gene in hcv-seropositive with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Life Sci*, 67:1719–1724, 2000.
- [47] V. Nedelcheva and I. Gut. P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica*, 24:1151–1175, 1994.
- [48] M. Pasanen and O. Pelkonen. The expression and environmental regulation of p450 enzymes in human placenta. *Critic. Rev. Toxicol.*, 24:211–229, 1994.
- [49] H. Raunio, M. Pasanen, J. Mäenpää, J. Hakkola, and O. Pelkonen. Expression of extrahepatic cytochrome p450 in humans. In G.M. Pacifici and G.N. Fracchia, editors, *Advances in Drug Metabolism in Man*, pages 234–287, Luxembourg, 1995. European Commission, Office for Official Publications of the European Communities.
- [50] F.J. Gonzalez and H.V. Gelboin. Role of human cytochromes p450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab. Rev.*, 26:165–183, 1994.
- [51] M.A. Butler, M. Iwasaki, F.P. Guengerich, and F.F. Kadlubar. Human cytochrome p-450_{PA} (p-450ia2), the phenacetine-o-deethylase, is primarily responsible for hepatic 3-demethylation of caffeine and n-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86:7696–7700, 1989.
- [52] R.A. Robson, A.P. Matthews, J.O. Miners, M.E. McManus, U.A. Meyer, P. de la M. Hall, and D.J. Birkett. Characterisation of theophylline metabolism in human liver microsomes. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 24:293–300, 1987.
- [53] F. J. Gonzalez. The molecular biology of cytochrome p450. *Pharmacol. Rev.*, 40:243–288, 1989.
- [54] S.G. Kim and R.F. Novak. Cytochrome p450 ii2e1 metabolism pyridines: Evidence for production of a reactive intermediate which exhibits redox-cycle activity and causes dna damage. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 283:753–758, 1991.
- [55] S. Koskela, J. Hakkola, J. Hukkanen, O. Pelkonen, M. Sorri, A. Saranen, S. Anttila, P. Fernandez-Salguero, F. Gonzalez, and H. Raunio. Expression of *CYP2A* genes in human liver and extrahepatic tissues. *Biochem. Pharmacol.*, 57:1407–1413, 1999.
- [56] T. Su, Z. Bao, Q.-Y. Zhang, T.J. Smith, J.-Y. Hong, and X. Ding. Human cytochrome p450 *cyp2a13*: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.*, 60:5074–5079, 2000.

- [57] O. Pelkonen, A. Rautio, H. Raunio, and M. Pasanen. Cyp2a6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology*, 144:139–147, 2000.
- [58] D.R. Nelson. Cytochrome p450 gene superfamily web site. url: <http://drnelson.utmem.edu/biblioa.html>, November 15th, 2001.
- [59] P. Pelkonen, M.L. Lang, P.W. Wild, M. Negishi, and R.O. Juvonen. Activation of aflatoxin b1 by mouse cyp2a enzymes and cytotoxicity in recombinant yeast cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 292:67–73, 1994.
- [60] T.S. Lai and J.Y.L. Chiang. Cloning and characterization of two major 3-methylcholanthrene inducible hamster liver cytochrome p450s. *Arch. Biochem. Biophys.*, 283:429–439, 1990.
- [61] M. Fukuhara, K. Nagata, K. Mizokami, Y. Yamazoe, A. Takanaka, and R. Kato. Complete cDNA sequence of a major 3-methylcholanthrene-inducible cytochrome p-450 isozyme (p-450afb) of syrian hamsters with high activity toward aflatoxin b1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 162:265–272, 1989.
- [62] D. Putt, X. Ding, M.J. Coon, and P.F. Hollenberg. Metabolism of aflatoxin b1 by rabbit and rat nasal mucosa microsomes and purified cytochrome p450, including isoforms 2a10 and 2a11. *Carcinogenesis*, 16:1411–1417, 1995.
- [63] H.F. Tiano, R.L. Wang, M. Hosokawa, C. Crespi, K.R. Tindall, and R. Langenbach. Human cyp2a6 activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (nnk): mutational specificity in the gpt gene of as52 cells. *Carcinogenesis*, 15:2859–2866, 1994.
- [64] H. Yamazaki, Y. Inui, H. Yun, F.P. Guengerich, and T. Shimada. Participation of rat liver cytochrome p450 2e1 in the activation of n-nitrosodimethylamine and n-nitrosodiethylamine to products genotoxic in an acetyltransferase-overexpressing salmonella typhimurium strain (nm2009). *Carcinogenesis*, 13:979–985, 1992.
- [65] J.-Y. Hong, X. Ding, T.J. Smith, M.J. Coon, and C.S. Yang. Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (nnk), a tobacco-specific carcinogen, by rabbit nasal microsomes and cytochrome p450s nma and nmb. *Carcinogenesis*, 13:2141–2144, 1992.
- [66] X. Ding and M.J. Coon. Immunochemical characterization of multiple forms of cytochrome p-450 in rabbit nasal microsomes and evidence for tissue-specific expression of p-450s nma and nmb. *Mol. Pharmacol.*, 37:489–496, 1990.
- [67] R.J. Duescher and A.A. Elfarra. Human liver microsomes are efficient catalysts of 1,3-butadiene oxidation: evidence for major roles by cytochromes p450 2a6 and 2e1. *Arch. Biochem. Biophys.*, 311:342–349, 1994.

- [68] T. Aoyama, K. Korzekwa, T. Matsunaga, K. Nagata, J. Gillette, H.V. Gelboin, and F.J. Gonzalez. cDNA-directed expression of rat p450s iia1 and iia2. catalytic activities toward steroids and xenobiotics and comparison with the enzymes purified from liver. *Drug Metabol. Dispos.*, 18:378–382, 1990.
- [69] P. Pelkonen, P. Honkakoski, O. Geneste, H. Bartsch, and M.A. Lang. Comparison of hamster and mouse reveals interspecies differences in the regulation of hepatic cyp2a isozymes. *Biochem. Pharmacol.*, 46:1681–1687, 1993.
- [70] M. Iwasaki, R.L.P. Lindberg, R.O. Juvonen, and M. Negishi. Site-directed mutagenesis of mouse steroid 7 α -hydroxylase (cytochrome p-450_{7 α}): role of residue-209 in determining steroid-cytochrome p-450 interaction. *Biochem. J.*, 291:569–573, 1993.
- [71] R. Lindberg and M. Negishi. Alteration of mouse cytochrome p450coh substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue. *Nature*, 339:632–634, 1989.
- [72] M. Nakajima, T. Yamamoto, K.-I. Nunoya, T. Yokoi, K. Nagashima, K. Inoue, Y. Funae, N. Shimada, and Y. Kuriowa. Role of human cytochrome p4502a6 in c-oxidation of nicotine. *Drug Metab. Dispos.*, 24:1212–1217, 1996.
- [73] M.L. Pianezza, E.M. Sellers, and R.F. Tyndale. Nicotine metabolism defect reduces smoking. *Nature*, 393:750, 1998.
- [74] R. Juvonen. Personal communication, 2001.
- [75] P. Salonpää, O. Pelkonen, A. Kojo, M. Pasanen, M. Negishi, and H. Raunio. Cytochrome p4502a5 expression and inducibility by phenobarbital is modulated by camp in mouse primary hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 205:631–637, 1994.
- [76] P. Honkakoski and M. Negishi. Regulatory dna elements of phenobarbital/responsive cytochrome p4502b genes. *J. Biochem. Toxicol.*, 12:3–9, 1998.
- [77] K. Aida and M. Negishi. Post-transcriptional regulation of coumarin7-hydroxylase (p450coh) induction by xenobiotics in mouse liver: mRNA stabilization by pyrazole. *Biochemistry*, 30:8041–8045, 1991.
- [78] B. Hahnemann, P. Salonpää, M. Pasanen, J. Mäenpää, P. Honkakoski, R. Juvonen, M.A. Lang, O. Pelkonen, and H. Raunio. Effect of pyrazole, cobalt and phenobarbital on mouse liver cytochrome p450 2a-4/5 (cyp2a-4/5) expression. *Biochem. J.*, 286:289–294, 1992.
- [79] A. Kojo, P. Viitala, M. Pasanen, O. Pelkonen, H. Raunio, and R. Juvonen. Induction of cyp2a5 by pyrazole and its derivatives in mouse primary hepatocytes. *Arch. Toxicol.*, 72:336–341, 1998.

- [80] P. Viitala, K. Posti, A. Lindfors, O. Pelkonen, and H. Raunio. camp mediated upregulation of cyp2a5 in mouse hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 280:761–767, 2001.
- [81] N.S. Foulkes, D. Whitmore, and P. Sassone-Corsi. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Biol. Cell*, 89:487–494, 1997.
- [82] J. Mäenpää, R. Juvonen, H. Raunio, A. Rautio, and O Pelkonen. Metabolic interactions of methoxsalen and coumarin in humans and mice. *Biochem. Pharmacol.*, 48:1363–1369, 1994.
- [83] T. Kimonen, R. Juvonen, e. Alhava, and M. Pasanen. The inhibition of cyp enzymes in mouse and human liver by pilocarpine. *Br. J. Pharmacol.*, 114:832–836, 1995.
- [84] I. Dalet-Beluche, X. Boulenc, G. Fabre, P. Maurel, and C. Bonfils. Purification of two cytochrome p450 isozymes related to cyp2a and cyp3a gene families from monkey (baboon, papio papio) liver microsomes: cross reactivity with human forms. *Eur. J. Biochem.*, 204:641–648, 1992.
- [85] E.A. Sotaniemi, A. Rautio, A. Bäckström, P. Arvela, and O. Pelkonen. Hepatic cytochrome p450 isozyme (cyp2a6 and cyp3a4) activities and fibrotic process in liver. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 39:71–76, 1995.
- [86] L.L. Koenigs, R.M. Peter, S.J. Thompson, A.E. Rettie, and W.F. Trager. Mechanism-based inactivation of human liver cytochrome p450 2a6 by 8-methoxypsoralen. *Am. Soc. Pharmacol. Ex. Ther.*, 25:1407–1415, 1997.
- [87] L.L. Koenigs and W.F. Trager. Mechanism-based inactivation p450 2a6 by furanocoumarins. *Biochemistry*, 37:10047–10061, 1998.
- [88] H. Gullstén. *Significance of polymorphisms in CYP2A6 gene*. Ph.d. diss., Department of Pharmacology and Toxicology, University of Oulu, FIN-90014 University of Oulu, Finland, Oulu, Finland, 2000. englische Version verfügbar unter URL:<http://herkules oulu.fi/isbn9514258576/>.
- [89] M. Oscarson, R.A. McLellan, H. Gullstén, J.A.G. Agundez, J. Benítez, A. Rautio, H. Raunio, O. Pelkonen, and M. Ingelman-Sundberg. Identification and characterisation of novel polymorphisms in the *CYP2A* locus: implications for nicotine metabolism. *FEBS Letters*, 460:321–327, 1999.
- [90] K. Kitagawa, N. Kunugita, M. Kitagawa, and T. Kamawoto. *CYP2A6*6*, a novel polymorphism in cytochrome p450 2a6, has a single amino acid substitution (r128q) that inactivates enzymatic activity. *J. Biol. Chem.*, 276:17830–17835, 2001.

- [91] H. Bourian, H. Gullstén, and W. Legrum. Genetic polymorphism of *cyp2a6* in the german population. *Toxicology*, 144:129–137, 2000.
- [92] M. Oscarson, H. Gullstén, A. Rautio, M.L. Bernal, B. Sinues, M.-L. Dahl J.H. Stengård, O. Pelkonen, H. Raunio, and M. Ingelman-Sundberg. Genotyping of human cytochrome p450 2a6 (*cyp2a6*) a nicotine c-oxidase. *FEBS Letters*, 438:201–205, 1998.
- [93] T. Paschke, M. Riefler, A. Schuler-Metz, L. Wolz, G. Scherer, C.M. McBride, and G. Bepler. Comparison of *cytochrome P450 2A6* polymorphism frequencies in caucasians and african-americans using new one-step pcr-rflp genotyping method. *Toxicology*, 168:259–268, 2001.
- [94] K. Nunoya, T. Yokoi, Y. Takahashi, K. Kimura, M. Kinoshita, and T. Kamataki. Homologous unequal cross-over within the human *CYP2A* gene cluster as a mechanism for the deletion of the entire *CYP2A6* gene associated with poor metabolizer phenotype. *J. Biochem.*, 160:402–407, 1999.
- [95] P. Fernandez-Salguero, S.M.G. Hoffman, S. Cholerton, H. Mohrenweiser, H. Raunio, A. Rautio, O. Pelkonen, J. Huang, W.E. Evans, J.R. Idle, and F.J. Gonzalez. A genetic polymorphism in coumarin 7-hydroxylation: sequence of the human *CYP2A* genes and identification of variant *CYP2A6* alleles. *Am. J. Hum. Genet.*, 57:651–660, 1995.
- [96] M. Oscarson, R.A. McLellan, H. Gullstén, Q.-Y. Yue, M.A. Lang, M.L. Bernal, B. Sinues, A. Hirvonen, H. Raunio, O. Pelkonen, and M. Ingelman-Sundberg. Characterisation and pcr-based detection of a *CYP2A6* gene deletion found at a high frequency in a chinese population. *FEBS Letters*, 448:105–110, 1999.
- [97] M. Iwasaki, T.A. Darden, L.G. Pedersen, and M. Negishi. Altering the regiospecificity of androstenedione hydroxylase activity in p450s 2a-4/5 by a mutation of residue at position 481. *Biochemistry*, 34:5054–5059, 1995.
- [98] T. Uno, E. Mitchell, K. Aida, M.H. Lambert, T.A. Darden, L.G. Pedersen, and M. Negishi. Reciprocal size-effect relationship of the key residues in determining regio- and stereospecificities of dhea hydroxylase activity in p450 2a5. *Biochemistry*, 36:3193–3198, 1997.
- [99] R. O. Juvonen, M. Iwasaki, T. Sueyoshi, and M. Negishi. Structural alteration of mouse p450coh by mutation of glycine-207 to proline: spin equilibrium, enzyme kinetics, and heat sensitivity. *Biochem. J.*, 294:31–34, 1993.
- [100] M. Iwasaki, T.A. Darden, L.G. Pedersen, D.G. Davis, R.O. Juvonen, T. Sueyoshi, and M. Negishi. Engineering mouse p450coh to a novel corticosterone 15 α -hydroxylase and modeling steroid-binding orientation in the substrate pocket. *J. Biol. Chem.*, 268:759–762, 1993.

- [101] M. Negishi, T. Uno, P. Honkakoski, T. Sueyoshi, T.A. Darden, and L.G. Pedersen. The roles of individual amino acids in altering substrate specificity of p450 2a4/2a5 enzymes. *Biochimie*, 78:685–694, 1996.
- [102] D.F.V. Lewis and B.G. Lake. Molecular modelling of members of the p4502a subfamily: application to studies of enzyme specificity. *Xenobiotica*, 25:585–598, 1995.
- [103] D.F.V. Lewis, M. Dickins, B.G. Lake, P.J. Eddershaw, M.H. Tarbit, and P.S. Goldfarb. Molecular modelling of the human cytochrome p450 isoform cyp2a6 and investigations of cyp2a substrate selectivity. *Toxicology*, 133:1–33, 1999.
- [104] H. Li and T.L. Poulos. The structure of cytochrome p450_{BM-3} heme domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nat. Struct. Biol.*, 4:140–146, 1997.
- [105] R.O. Juvonen, J. Gynther, M. Pasanen, E. Alhava, and A. Poso. Pronounced differences in inhibition potency of lactone and non-lactone compounds for mouse and human coumarin-7-hydroxylases (cyp2a5 and cyp2a6). *Xenobiotica*, 30:81–92, 2000.
- [106] A. Poso, R. Juvonen, and J. Gynther. Comparative molecular field analysis of compounds with cyp2a5 binding affinity. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 14:507–511, 1995.
- [107] A. Schappach. *Molecular Modelling Untersuchungen an Steroidhydroxylasen mit therapeutischer Bedeutung*. Ph.d. diss., Institut für Pharmazeutische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany, 2000.
- [108] F. Stoll. *Theoretische Untersuchungen zur Entwicklung eines Prostaglandin-Rezeptormodells*. Ph.d. diss., Institut für Pharmazeutische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany, 2001. als elektronische Version verfügbar unter: URL:<http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2001/stoll.html>.
- [109] Molecular Simulations Inc. *Insight II*. San Diego, release 2000 edition, March 2000.
- [110] P. Dauber-Osguthorpe, V.A. Roberts, D.J. Osguthorpe, J. Wolff, M. Genest, and A.T. Hagler. Structure and energetics of ligand binding to proteins: Escherichia coli dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins*, 4:31–47, 1988.
- [111] H.J.C. Berendsen, D. van der Spoel, and R. van Drunen. Gromacs: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp. Phys. Comm.*, 91:43–56, 1995.

- [112] A.E. Torda, R.M. Scheek, and W.F. van Gunsteren. Time-dependent distance restraints in molecular dynamics simulations. *Chem. Phys. Lett.*, 157:289–294, 1989.
- [113] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, A. DiNola, and J.R. Haak. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, 81:3684–3690, 1984.
- [114] S. Miyamoto and P. A. Kollman. Settle: An analytical version of the shake and rattle algorithms for rigid water models. *J. Comp. Chem.*, 13:952–962, 1992.
- [115] B. Hess, H. Bekker, H.J.C. Berendsen, and J.G.E.M. Fraaije. Lincs: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.*, 18:1463–1472, 1997.
- [116] W.F. van Gunsteren, S.R. Billeter, A.A. Eising, P.H. Hünenberger, P. Krüger, A.E. Mark, W.R.P. Scott, and I.G. Tironi. *Biomolecular simulation: The GRO-MOS96 manual and user guide*. Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich, Switzerland, 1996.
- [117] D. van der Spoel, A.R. van Buuren, E. Apol, P.J. Meulenhoff, D.P. Tieleman, A.L. Sijbers, B. Hess, K.A. Feenstra, and H.J. Berendsen. *Gromacs User Manual version 3.0*. Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands. Internet: <http://www.gromacs.org>, 2001.
- [118] U. Stocker and W.F. van Gunsteren. Molecular dynamics simulation of hen egg white lysozyme: A test of the gromos96 force field against nuclear magnetic resonance data. *Proteins*, 40:145–153, 2000.
- [119] V. Helms and R. Wade. Thermodynamics of water mediating protein-ligand interactions in cytochrome p450cam: A molecular dynamics study. *Biophys. J.*, 69:810–824, 1995.
- [120] R. Walser, P.H. Hünenberger, and W.F. van Gunsteren. Comparison of different schemes to treat long-range electrostatic interactions in molecular dynamics simulations of a protein crystal. *Proteins*, 44:509–519, 2001.
- [121] P.H. Hünenberger and J.A. McCammon. Effect of artificial periodicity in simulations of biomolecules under ewald boundary conditions: a continuum electrostatics study. *Biophys. Chem.*, 78:69–88, 1999.
- [122] T. Darden, D. York, and L. Pedersen. Particle mesh ewald: An n-log(n) method for ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, 98:10089–10092, 1993.
- [123] U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L.G. Pedersen. A smooth particle mesh ewald potential. *J. Chem. Phys.*, 103:8577–8592, 1995.

- [124] P.J. Goodford. A computational procedure for determining energetically favourable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.*, 28:849–857, 1985.
- [125] D.N. Boobbyer, P.J. Goodford, P.M. McWhinnie, and R.C. Wade. New hydrogen-bond potentials for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. *J. Med. Chem.*, 32:1083–1094, 1989.
- [126] R.C. Wade, K.J. Clark, and P.J. Goodford. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 1. ligand probe groups with the ability to form two hydrogen bonds. *J. Med. Chem.*, 36:140–147, 1993.
- [127] R.C. Wade and P.J. Goodford. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 2. ligand probe groups with the ability to form more than two hydrogen bonds. *J. Med. Chem.*, 36:148–156, 1993.
- [128] Multivariate Infometrics Analysis, Viale dei Castagni 16, Perugia, Italy. *GOLPE 4.0*, 2001. Viale dei Castagni 16, Perugia, Italy.
- [129] J. Nilsson, H. Wikstrom, A. Smilde, S. Glase, T. Pugsley, G. Cruciani, M. Pastor, and S. Clementi. Grid/golpe 3d quantitative structure-activity relationship study on a set of benzamides and naphthamides, with affinity for the dopamine d3 receptor subtype. *J. Med. Chem.*, 40:833–840, 1997.
- [130] T. Sueyoshi, L.J. Park, R. Moore, R.O. Juvonen, and M. Negishi. Molecular engineering of microsomal p450 2a-4 to a stable, water-soluble enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 322:265–271, 1995.
- [131] J.D. Thompson, D.G. Higgins, and T.J. Gibson. Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22:4673–4680, 1994.
- [132] J.H. Blankenburg. Zweidimensionales parametrisches alignment biomolekularer sequenzen. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, 1995.
- [133] Y.-T. Chang and G. Loew. Construction and evaluation of a three-dimensional structure of cytochrome p450 chop enzyme (cyp105c1). *Protein Engineering*, 9:755–766, 1996.
- [134] P.S. Stayton and S.G. Sligar. The cytochrome p450_{cam} binding surface as defined by site-directed mutagenesis and electrostatic modelling. *Biochemistry*, 29:7381–7386, 1990.

- [135] S.G. Sligar, D. Filipovic, and P.S. Stayton. Mutagenesis of cytochromes p450_{cam} and b₅. *Meth. Enzymol.*, 206:31–49, 1991.
- [136] A.A. Salamov and V.V. Solovyev. Protein secondary structure prediction using local alignments. *J. Mol. Biol.*, 268:31–36, 1977.
- [137] A.A. Salamov and V.V. Solovyev. Prediction of protein secondary structure by combining nearest-neighbor. *J. Mol. Biol.*, 247:11–15, 1995.
- [138] J.D. Thompson, D.G. Higgins, and T.J. Gibson. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.*, 292:195–202, 1999.
- [139] M.J. Bower, F.E. Cohen, and R.L. Dunbrack Jr. Prediction of protein side-chain rotamers from a backbone-dependent rotamer library: A new homology modeling tool. *J. Mol. Biol.*, 267:1268–1282, 1997.
- [140] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, and J.M. Thornton. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 26:283–291, 1993.
- [141] M.C. Vega, J.C. Martinez, and L. Serrano. Thermodynamic and structural characterization of asn and ala residues in the disallowed ii'-region of the ramachandran plot. *Protein Science*, 9:2322–2328, 2000.
- [142] R.O. Juvonen, M. Iwasaki, and M. Negishi. Structural function of residue-209 in coumarin 7-hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, 266:16431–16435, 1991.
- [143] M. Iwasaki, R.O. Juvonen, R.L.P. Lindberg, and M. Negishi. Alteration of high and low spin equilibrium by a single mutation of amino acid 209 in mouse cytochromes p450. *J. Biol. Chem.*, 266:3380–3382, 1990.
- [144] K. Yoshizawa, T. Kamachi, and Y. Shiota. A theoretical study of the dynamic behaviour of alkane hydroxylation by compound i model of cytochrome p450. *J. Am. Chem. Soc.*, 123:9806–9816, 2001.
- [145] M. Hata, Y. Hirano, T. Hoshino, and M. Tsuda. Monooxygenation mechanism by cytochrome p-450. *J. Am. Chem.Soc.*, 123:6410–6416, 2001.
- [146] M. Negishi, M. Iwasaki, R. Juvonen, T. Sueyoshi, T.A. Darden, and L.G. Pedersen. Structural flexibility and functional versatility of cytochrome p450 and rapid evolution. *Mutation Research*, 350:43–50, 1996.
- [147] M. Iwasaki, T.A. Darden, C.E. Parker, K.B. Tomer, L.G. Pedersen, and M. Negishi. Inherent versatility of p-450 oxygenase. *J. Biol. Chem.*, 269:9079–9083, 1994.

- [148] A. Poso, J. Gynther, and R. Juvonen. A comparative molecular field analysis of cytochrome p450 2a5 and 2a6 inhibitors. *J. Comp.-Aid. Mol. Design*, 15:195–202, 2001.
- [149] A. Vedani, P. Zbinden, J.P. Snyder, and P.A. Greenidge. Pseudoreceptor modeling: The construction of three-dimensional receptor surrogates. *J. Am. Chem. Soc.*, 117:4987–4994, 1995.
- [150] P. Zbinden, M. Dobler, G. Folkers, and A. Vedani. Prgen: Pseudoreceptor modeling using receptor-mediated ligand alignment and pharmacophore equilibration. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 17:122–130, 1998.
- [151] R. Juvonen. Personal communication, 2002.
- [152] E. Lindahl, B. Hess, and D. van der Spoel. Gromacs 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.*, 7:306–317, 2001.
- [153] T.L. Poulos. Cytochrome p450. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 5:767–774, 1995.

Anhang A

Bezeichnung der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
neutral		
Glycin	Gly	G
Alanin	Ala	A
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Leucin	Leu	L
Isoleucin	Iso	I
Säuren und Amide		
Asparaginsäure	Asp	D
Asparagin	Asn	N
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Basen		
Arginin	Arg	R
Lysin	Lys	K
S-haltige		
Cystein	Cys	C
Methionin	Met	M
aromatisch		
Phenylalanin	Phe	F
Tyrosin	Tyr	Y
Heterocyclen		
Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H
Prolin	Pro	P

Anhang B

Verwendete Hard- und Software

Die Berechnungen in dieser Arbeit wurden mit den folgenden Rechnersystemen durchgeführt:

Silicon Graphics Workstations:

- IRIS O2 R12000
- IRIS INDIGO² R10000
- IRIS O2 R5000
- Origin 2000 mit 38 R10000 Prozessoren (am Rechenzentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Folgende Software wurde genutzt:

PSIPRED	Programm zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Proteinen
SSPAL	Programm zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Proteinen
INSIGHT II	Grafikmodul des Programmpakets INSIGHT II/DISCOVER der Firma accelrys zur Visualisierung
DISCOVER	Rechenmodul des Programmpakets INSIGHT II/DISCOVER der Firma accelrys zur molekülmechanischen Berechnung in verschiedenen Kraftfeldern
HOMOLOGY	Modul des Programmpakets INSIGHT II/DISCOVER der Firma accelrys zur Erstellung von Homologie-basierten Protein-Modellen
SCWRL	Programm zur Optimierung der Position von Protein-Seitenketten Computermodellen nach Mutation
GROMACS	Molecular Modelling-Software zur Berechnung von Moleküldynamik-Simulationen in einer Lösungsmittelbox
GRIN/GRID	Programmpaket zur Berechnung molekularer Interaktionsfelder
GOLPE	Statistikprogramm, das die Durchführung einer Hauptkomponenten-Analyse mit anschließender PLS-Statistik ermöglicht
SYBYL	Molecular Modelling-Paket der Firma TRIPOS

Anhang C

Abkürzungsverzeichnis, Einheiten

Abkürzungen

cAMP	cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat
CoMFA	Comparative Molecular Field Analysis
CVFF	Consistent Valence Force Field
CYP	Cytochrom P450
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FMN	Flavin-Mono-Nucleotid
H-Brücke	Wasserstoffbrücke
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
NAD/NADP	Nicotin-Adenin-Dinucleotid/-Phosphat
NDEA	N-Nitroso-diethylamin
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
P450 _{BM-3}	Cytochrom P450 Fettsäure-Monooxygenase aus <i>Bacillus megaterium</i>
P450 _{cam}	Cytochrom P450 Campherhydroxylase aus <i>Pseudomonas putida</i>
P450 _{EryF}	Monooxygenase aus <i>Saccharopolyspora erythraea</i>
P450 _{terp}	Cytochrom P450 α -Terpineol-Hydroxylase aus <i>Pseudomonas</i>
PCA	Principle Component Analysis
PLS	Partial Least Square
PME	Particle Mesh Ewald

q^2	kreuzvalidierter Korrelationskoeffizient
QSAR	Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehung
r^2	Korrelationskoeffizient
RMS / RMSD	Root Mean Square / Deviation
SCR	Structurally Conserved Region
SDEP	Standard Deviation of Error Prediction
SPC-Wasser	Single Point Charge-Modell für Wasser
SRS	Substrate Recognition Site
SVR	Structurally Variable Regions

Einheiten

Å	Ångström, Längeneinheit ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
K	Kelvin, Temperatureinheit ($0 \text{ K} = -273,15^\circ \text{ Celsius}$)
kJ	Kilojoule, Energieeinheit ($1 \text{ kJ} = 0,239 \text{ kcal}$)
ps	Picosekunde, Zeiteinheit ($1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s}$)
mol	Mol, Einheit der Stoffmenge ($1 \text{ mol} = 6,023 \cdot 10^{23} \text{ Teilchen}$)

Anhang D

INSIGHT II-BCL-Macros

Macros in BCL-Programmiersprache (Biosym Command Language) sind dazu geeignet in die Software INSIGHT II eingelesen zu werden und unter dieser Software abzulaufen.

D.1 Atomkoordinaten_CORTI.bcl

Das BCL-Makro Atomkoordinaten_CORTI.bcl wurde verwendet, um aus einer Trajektorien-Datei im .arc-Format (INSIGHT II-Format), die nur Häm, Sauerstoff-Molekül und Corticosteron enthält, die Koordinaten der wichtigen Atome (C₁₅, O1, FE) zu extrahieren oder zu erzeugen (H an C₁₅). Aus den Koordinaten wurden dann mittels Vektorrechnung die Abstände und Winkel für die erfolgte Auswertung berechnet.

```
Define_Macro Koordinaten_CORTI \  
  Lstring Molekuel \  
  Int Frames  
  
  Int index, anzeigemarker  
  Lstring Kopie, anzeige  
  Coord posC,posO,posFE,posH  
  Float pi, c1, c2, c3, o1, o2, o3, fe1, fe2, fe3, h1, h2, h3, ho1, ho2,  
  ho3, ho, c, o, fe, h, oxf1, oxf2, oxf3, oxf, n1, n2, n3, hs1, hs2, hs3,  
  hs, hp1, hp2, hp3, hp, nxo1, nxo2, nxo3, nxo, richtung, x, gamma, delta,  
  alpha, theta, gamma1, CHOWinkel
```

```

Set_Param_Pick Molekuel MOLECULE_ASSEMBLIES

Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%s" "Frame" "\t" "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%s" "C20" "\t" "\t" "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%s" "O1" "\t" "\t" "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%s" "FE" "\t" "\t" "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%s" "H" "\t" "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%s" "OH-Abstand" "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%s" "CO-Abstand" "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%s" "Laenge HParal" "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%s" "CHO-Winkel" "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%s" "gamma" "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%s" "alpha" "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%s" "theta" "\n"

pi = 3.141592

Foreach $index from 1 to $Frames
  Conformation Trajectory Frame $index
  print $index
  Copy Object -To_Clipboard -Displace $Molekuel ("F_//$index)
  Bond Modify_Order -Automatic Single ("F_//$index//":3:C19")
("F_//$index//":3:C20")
  posC = { XYZ World ("F_//$index//":3:C20) }
  posO = { XYZ World ("F_//$index//":2:O1) }
  posFE = { XYZ World ("F_//$index//":1:FE) }
  posH = { XYZ World ("F_//$index//":3:H201) }
  CHOWinkel = { Angle -Monitor -Output_File 0 180 ("F_//$index//":2:O1)
("F_//$index//":3:H201) ("F_//$index//":3:C20) }

  print $CHOWinkel
  print $posC
  print $posO
  print $posFE
  print $posH

# Berechnung der Vektoren und ihrer Laenge / Ursprung ist C-Atom
o1 = $posO.x - $posC.x
o2 = $posO.y - $posC.y
o3 = $posO.z - $posC.z
o = sqrt($o1*$o1 + $o2*$o2 + $o3*$o3)
fel = $posFE.x - $posC.x
fe2 = $posFE.y - $posC.y
fe3 = $posFE.z - $posC.z
fe = sqrt($fel*$fel + $fe2*$fe2 + $fe3*$fe3)

```

```

h1 = $posH.x - $posC.x
h2 = $posH.y - $posC.y
h3 = $posH.z - $posC.z
h = sqrt($h1*$h1 + $h2*$h2 + $h3*$h3)

#Berechnung des Abstands von H und Sauerstoff O
ho1 = $posO.x - $posH.x
ho2 = $posO.y - $posH.y
ho3 = $posO.z - $posH.z
ho = sqrt($ho1*$ho1 + $ho2*$ho2 + $ho3*$ho3)
# Berechnug Normalenvektor der Ebene C-O-Fe als Vektorprodukt der
Vektoren o und f
oxf1 = $o2 * $fe3 - $o3 * $fe2
oxf2 = $o3 * $fe1 - $o1 * $fe3
oxf3 = $o1 * $fe2 - $o2 * $fe1
oxf = sqrt($oxf1*$oxf1 + $oxf2*$oxf2 + $oxf3*$oxf3)

n1 = $oxf1 / $oxf
n2 = $oxf2 / $oxf
n3 = $oxf3 / $oxf

# Berechnung gamma (Winkel zw. o und f)
x = Skalarprod (o,f)/(o*f) = cos gamma

x = ($o1*$fe1 + $o2*$fe2 + $o3*$fe3) / ($o * $fe)
gamma = ((($pi / 2) - atan($x / sqrt(1 - $x*$x))) / $pi) * 180
print ("gamma = "//$gamma)

# Berechnung des Anteils von h aus der Ebene (hs), Winkel aus der Ebene
und Projektion von h in die Ebene (hp)

hs = $h1 * $n1 + $h2 * $n2 + $h3 * $n3

# Berechnung von theta / x = cos delta / theta (Winkel aus der Ebene) =
90 - delta
x = $hs / $h
delta = ((($pi / 2) - atan($x / sqrt(1 - $x*$x))) / $pi) * 180
theta = 90 - $delta
print ("theta = "//$theta)

hs1 = $hs * $n1
hs2 = $hs * $n2
hs3 = $hs * $n3

```

```

hp1 = $h1 - $hs1
hp2 = $h2 - $hs2
hp3 = $h3 - $hs3
hp = sqrt($hp1*$hp1 + $hp2*$hp2 + $hp3*$hp3)

# Berechnung von alpha (Zeigt hp in Richtung FE/O-Achse) / x = cos alpha

x = ($o1*$hp1 + $o2*$hp2 + $o3*$hp3) / ($o * $hp)
alpha = ((($pi / 2) - atan($x / sqrt(1 - $x*$x))) / $pi) * 180

nxo1 = $n2 * $o3 - $n3 * $o2
nxo2 = $n3 * $o1 - $n1 * $o3
nxo3 = $n1 * $o2 - $n2 * $o1
nxo = sqrt($nxo1*$nxo1 + $nxo2*$nxo2 + $nxo3*$nxo3)

richtung = $hp1 * $nxo1 + $hp2 * $nxo2 + $hp3 * $nxo3
If ($richtung < 0)
    alpha = 360 - $alpha
End

# Anzeige von alpha als Winkel zw. -180 und 180 Grad um Vektor o
If ($alpha > 180)
    alpha = $alpha - 360
End

print ("alpha = "//$alpha)

If ($alpha >= 0 && $alpha < $gamma)
    anzeige = "innerhalb"
    anzeigemarker = 1
End
Else
    anzeige = "ausserhalb"
    anzeigemarker = 0
End

print $anzeige

Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%s" ("F_"//$index) "\t"
# Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $posC.x "\t"
# Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $posC.y "\t"
# Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $posC.z "\t"
# Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $posO.x "\t"
# Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $posO.y "\t"

```

```

# Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $posO.z "\t"
# Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $posFE.x "\t"
# Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $posFE.y "\t"
# Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $posFE.z "\t"
# Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $posH.x "\t"
# Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $posH.y "\t"
# Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $posH.Z "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $ho "\t" "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $o "\t" "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $hp "\t" "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $CHOWinkel "\t" "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $gamma "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $alpha "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%.2f" $theta "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%s" $anzeige "\t"
Write ($Molekuel//"_Koord_4_Atome") "%i" $anzeigemarker "\n"

Delete Object ("F_"//$index)
End

End_Macro
Add_To_Pulldown Koordinaten_CORTI

```

D.2 Atomkoordinaten_DEOXY.bcl

Im BCL-Makro Atomkoordinaten_DEOXY.bcl wurden einige der molekülspezifischen Nummerierungen verändert, um dem veränderten Substrat Deoxycorticosteron gerecht zu werden. Der sonstige Aufbau und die Aufgabe des Makros war identisch zum unter D.1 aufgeführten Makro Atomkoordinaten-CORTI.bcl.

Curriculum Vitae

NAME	Gunther Stahl
GEBURTSTAG	02. Januar 1971
GEBURTSORT	Böblingen
FAMILIENSTAND	verheiratet
SCHULBILDUNG	
1977 - 1981	Pestalozzi-Grundschule, Erftstadt
1981 - 1990	Städtisches Gymnasium Lechenich, Erftstadt
WEHRDIENST	
1990 - 1991	Grundwehrdienst in Daun / Eifel
STUDIUM	
10/1991 - 04/1992	Studium der Meteorologie an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
04/1992 - 02/1996	Studium der Pharmazie an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
04/1996	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
04/1996 - 10/1996	Pharmaziepraktikum in der Kronen-Apotheke Stammheim, Stuttgart
11/1996 - 04/1997	Pharmaziepraktikum bei der Kohne Pharma GmbH, Haan
07/1997	Approbation als Apotheker
BERUFSTÄTIGKEIT	
07/1997 - 12/1997	angestellter Apotheker in der Europa-Apotheke, Düsseldorf
seit 01/1998	Promotionsstudent und Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Danksagung

Es gibt viele Menschen, denen ich an dieser Stelle danken müsste. Leider werde ich bestimmt einige nicht erwähnen. Seid bitte versichert ich habe Euch nicht vergessen. Allen die ich hier nicht namentlich danken kann mögen sich mit dieser Erwähnung berücksichtigt fühlen.

Ich möchte vor allem meinem Chef, Professor Höltje, danken, der nicht nur eine sehr gute Arbeitsumgebung in seinem Institut geschaffen hat und der für seine Mitarbeiter immer Zeit hat, wenn sie ein Problem haben, sondern er war es auch, der mich dazu genötigt hat die Freuden des Wein trinkens kennenzulernen. Ohne Sie Herr Höltje wäre ich vielleicht immer noch Abstinenzler. Ich hätte doch was verpasst. Auch dafür – danke.

Neben meinem Chef gibt es am Institut noch weitere wichtige Personen ohne die nichts läuft. Danke an Heiko, der mir meine erste Einführung in UNIX gegeben hat und an Peter (Heiko's Nachfolger als Systemadministrator), der immer ein offenes Ohr hatte, der klaglos riesige Mengen an CD's brennt ("Wenn's wichtig is', dann mach 'mer das halt!") und seine technischen Fähigkeiten immer gern der gesamten Arbeitsgruppe zur Verfügung stellt.

Besonders gut erinnere ich mich an Annette, die ich noch vor meiner Bewerbung in Düsseldorf kennen lernen dürfte. Ihre Freundlichkeit hat meinen ersten (guten) Eindruck des Instituts geprägt.

Mit Ulrike zu arbeiten war eine große Herausforderung (ich konnte soooo viel lernen) und eine große Freude. Im Labor habe ich immer ganz große Ohren gemacht, wenn Ulrike etwas erklärt hat. Wer hätte gedacht, dass ich nochmal das Vergnügen

haben werde mit Ihr zu arbeiten und von ihr zu lernen (wieder ganz große Ohren). Ich freue mich darauf!

Friederike, eine Kollegin im Praktikum (von der ich viel gelernt habe), Zimmergenossin (ich werde unser Zweier-/Viererbüro vermissen) und Freundin. Danke für viele Gespräche und Diskussionen. Ich kann mir niemanden vorstellen, mit dem ich lieber in einem Büro gesessen wäre.

Robin, der auch in das Viererbüro gehört und der mich mit seiner Schaffenskraft immer wieder in Erstaunen versetzt hat.

Ich danke allen anderen Mitgliedern des Höltje-Arbeitskreises (Aktuelle und Ehemalige), die zur sehr guten Stimmung innerhalb der Gruppe beigetragen haben.

Neben der Arbeit habe ich auch vielen Menschen zu danken, die mir in meiner Zeit in Düsseldorf begegnet sind:

Jane und Robert, mit denen wir viele schöne Tage und Abende bei Ihnen, bei uns, beim Sport, im Kino und in der Sauna verbracht haben, und die nicht müde geworden sind mich, vorallem auch in der Endphase des Zusammenschreibens, immer wieder abzulenken und zu unterhalten.

Guido und Yvonne, danke für die freundliche Aufnahme in euren Partykreis und die vielen anschliessenden Treffen.

Uta, Thorsten, Christine und Marc, die Martin's mit Simone und Silke – unser Tanzkreis – die den Mittwoch abend zu einer festen Institution haben werden lassen. Ohne Euch macht Tanzen nur halb so viel Spass!!!

Dank auch an all meine Basketballer, die mich immer wieder dazu bewegt haben mich zu bewegen und nicht faul auf dem Sofa zu sitzen und dick zu werden. Ich kann nur hoffen nochmal eine so nette Truppe zu finden.

Bedanken muss ich mich auch bei Heiko, den ich eigentlich noch überholen wollte (aber da war wohl mehr der Wunsch der Vater des Gedanken), der mir in Gesprächen immer wieder neue Gedanken vermittelt hat (Physiker können halt doch fast alles) und dafür, das er einfach der beste Bruder von der Welt ist.

Ich möcht mich bei meinen Eltern bedanken. Ihr seid mir in vielen Punkten Leitfiguren und Vorbilder. Mit Euch kann ich lachen, reden, weinen und diskutieren. Euer

Vertrauen schafft den Freiraum von dem ich heute noch zehre, der mich heute noch begleitet. Ich hoffe ich kann meinen Kindern annähernd so viel geben zu können wie Ihr mir gegeben habt.

Bedanken muss ich mich auch bei Maïke. Du warst mein Ansporn diese Arbeit rechtzeitig abzugeben. Durch deine Ankunft hatte ich keine Chance mehr meiner Genügsamkeit nachzugehen. Nebenbei stellst Du gerade jetzt mein Leben auf den Kopf, aber auch das ist unheimlich spannend.

Den allergrößten Anteil an der Entstehung dieser Arbeit hat aber ohne Frage Christiane. Danke für deine unendliche Unterstützung, deine Geduld mit mir (auch wenn ich manchmal ein wenig schwierig war), deine Liebe und danke für das unglaublich kleine und doch so unfassbar große Geschenk, das Du mir gemacht hast.
Ich liebe Dich.